

Q  
SC  
C  
1657

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS

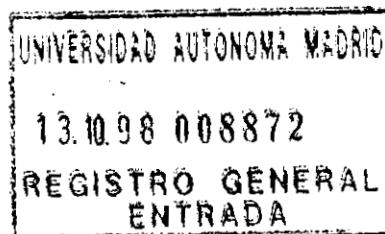
CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN AGRÍCOLA  
DE UN HUMATO FÉRRICO PROCEDENTE DE  
SISTEMAS ACUÁTICOS

R. B. C 67.699



ARACELI PÉREZ SANZ  
Octubre, 1998

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS



**CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN AGRÍCOLA  
DE UN HUMATO FÉRRICO PROCEDENTE DE  
SISTEMAS ACUÁTICOS**

**ARACELI PÉREZ SANZ**  
Octubre, 1998

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan José Lucena por haberme apoyado y confiado en el buen fin de este trabajo. Gracias por tener siempre abierta la puerta del despacho.

Al Dr. Alfredo Polo, del Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), por su ayuda científica e inestimable apoyo personal.

Al Dr. Juan Luis Valenzuela del Departamento de producción vegetal de la Universidad de Almería, al Dr. Francisco Legaz del I.V.I.A y al Dr. Tomás Casero de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de la Universidad de Lleida por su siempre atenta colaboración.

Al Dr. Florencio Torres Yugeros de la Universidad de Gerona, que siempre ha descolgado su teléfono para ayudarme a salir del laberinto.

Al Dr. John Farmer y a la Dra. Margaret Graham del Departamento de Química de la Universidad de Edimburgo, que me acogieron en mi estancia en dicho Centro y me ayudaron en la realización de parte del trabajo aquí descrito. Mi especial agradecimiento a la MSc. Ana Maraffino que hizo tan agradable mi vida cotidiana en Escocia.

Al Dr. Agustín Gárate y al Dr. Ramón Carpena por su afecto personal y docta orientación.

A todos los que han participado de forma directa en la realización de este trabajo y lo han compartido, especialmente a las licenciadas Cristina Arranz y Ana Álvarez; al licenciado Javier López y a las técnicas Ana Gómez y Olga Martínez. No puedo tampoco olvidar a las doctoras Lourdes Hernández y Elvira Esteban que tanto me acompañaron en Valencia. Gracias, Cristina, Ana, Javi, Ana, Olga, Lourdes y Elvira.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio del 202, a los que se fueron, a los que han venido, y especialmente a los que han soportado las continuas llamadas de teléfono este último año. Gracias por haberme ayudado tanto.

A la Dra. Martín Cabrejas por su ánimo y cariño.

Un recuerdo para Salvador Bosch por su buen trato valenciano.

A Beatriz, mi hermana, que siempre ha estado ahí.

Y a él, por comprender que todo esto merece la pena.

*"Nunca se sabe si andamos sobre simientes o sobre residuos".*

*A. De Musset*



*A mis padres, con los que tanto he aprendido*

*Para Araceli*

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>NUTRICIÓN FÉRRICA DE LA PLANTA .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Importancia del hierro en los cultivos .....	3
1.2.	Disponibilidad de Fe en suelo .....	5
1.3.	Eficiencia de la planta en la adquisición del hierro .....	6
1.4.	Métodos de diagnóstico de la clorosis férrica .....	9
1.5.	Corrección de la clorosis férrica .....	11
<b>2.</b>	<b>UTILIZACIÓN AGRÍCOLA DE SUBPRODUCTOS ORIGINADOS EN PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS .....</b>	<b>12</b>
2.1.	Concepto de biosólido .....	12
2.2.	Características de los productos biosólidos .....	13
2.3.	Valor nutricional de los biosólidos .....	14
2.4.	Inconvenientes del uso de biosólidos .....	19
2.4.1.	Elementos traza .....	19
2.4.2.	Presencia de compuestos tóxicos orgánicos .....	22
2.4.3.	Patógenos .....	23
2.5.	Usos especiales en la aplicación de biosólidos .....	24
<b>3.</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS .....</b>	<b>27</b>
3.1.	Materia orgánica .....	27
3.2.	Origen de las sustancias húmicas .....	29
3.3.	Métodos para la extracción de las sustancias húmicas .....	30
3.4.	Características estructurales de las sustancias húmicas .....	33
3.5.	Características químicas de las sustancias húmicas .....	34
3.5.1.	Sustancias húmicas de suelo .....	36
3.5.2.	Sustancias húmicas en aguas superficiales .....	38
3.5.3.	Características químicas de ácidos fúlvicos y húmicos procedentes de lodos y enmendantes de suelos .....	40
	a) Ácidos fúlvicos .....	40
	b) Ácidos húmicos .....	42
<b>4.</b>	<b>INTERACCIONES DE LA MATERIA ORGÁNICA CON LOS IONES METÁLICOS .....</b>	<b>43</b>
4.1.	Importancia de la quelación .....	43
4.2.	Agentes quelantes de la materia orgánica .....	46
4.2.1.	Compuestos bioquímicos .....	46
	a) Ácidos orgánicos de bajo peso molecular ....	47
	b) Sideróforos hidroxámicos y fitosideróforos ...	48
	c) Fenoles y ácidos fenólicos .....	49
	d) Polifenoles .....	49
4.2.2.	Ácidos fúlvicos .....	50
4.3.	Efectos del carbono orgánico disuelto y en estado coloidal sobre la biodisponibilidad y transporte de los iones metálicos. ....	50
4.3.1.	Solubilización de sólidos .....	51

4.3.2.	Adsorción .....	52
<b>5.</b>	<b>EFFECTOS DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS SOBRE LA PLANTA .</b>	<b>54</b>
5.1.	Respuesta de las plantas a las sustancias húmicas .....	55
5.1.1.	Germinación y crecimiento de plántulas .....	55
5.1.2.	Iniciación y crecimiento radicular .....	56
5.1.3.	Desarrollo del tallo .....	58
5.2.	Mecanismos involucrados con la estimulación del crecimiento en planta ....	59
5.2.1.	Absorción de macronutrientes .....	59
5.2.2.	Absorción de micronutrientes .....	62
5.2.3.	Absorción de las sustancias húmicas y efectos bioquímicos .....	64
5.2.3.1	Absorción de sustancias húmicas .....	64
5.2.3.2	Efectos bioquímicos .....	64
a)	Efectos sobre las membranas .....	64
b)	Energía de metabolismo .....	65
c)	Actividad enzimática .....	65
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>71</b>
<b>III.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS .....</b>	<b>75</b>
<b>1.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>77</b>
1.1.	Origen de los productos .....	77
1.2.	Análisis de los productos .....	78
1.3.	Solubilidad en agua en diferentes condiciones de Ca-pH .....	79
1.4.	Estudio de su interacción con suelos y materiales del suelo .....	81
1.4.1.	Materiales edáficos .....	81
1.4.2.	Suelos de uso agrícola. Caracterización. ....	82
1.4.3.	Ensayo de agitación .....	84
<b>2.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>87</b>
2.1.	Análisis de los productos .....	87
2.2.	Solubilidad en agua en diferentes condiciones de Ca-pH .....	90
2.3.	Estudio de su interacción con suelos y materiales del suelo .....	94
<b>IV.</b>	<b>ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN Fe-MATERIA ORGÁNICA POR CROMATOGRAFÍA DE PERMEACIÓN SOBRE GEL</b>	
<b>1.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>107</b>
1.1.	Extracto alcalino .....	107
1.1.1.	Extracción alcalina .....	107
1.1.2.	Caracterización del Extracto húmico total sin fraccionar. ....	109
1.1.3.	Ensayos de fraccionamiento. ....	110
1.1.3.1	Fraccionamiento del Extracto húmico en Sephadex G-751	
1.1.3.2	Fraccionamiento del extracto húmico total .....	113

A)	Elución con agua	113
a)	Sephadex G-25	113
b)	Sephadex G-75	113
c)	Sephadex G-200	114
B)	Elución con NaOH 0,1 M	114
a)	Sephadex G-25	114
b)	Sephadex G-75	115
1.1.4.	Fraccionamiento del extracto del agua procedente de la diálisis	115
1.1.5.	Aplicación de los ensayos de fraccionamiento en la especiación de Fe en el extracto húmico total	116
1.2.	Extracto acuoso	117
1.2.1.	Extracción acuosa	117
1.2.2.	Caracterización del extracto acuoso sin fraccionar.	118
1.2.3.	Fraccionamiento del extracto acuoso	118
a)	Sephadex G-15	118
b)	Sephadex G-25	119
<b>2.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>119</b>
2.1.	Extracción alcalina	119
2.1.1.	Caracterización del Extracto húmico total sin fraccionar.	124
2.1.2.	Ensayos de fraccionamiento.	129
2.1.2.1	Fraccionamiento del Extracto húmico en Sephadex G-75	129
2.1.2.2	Fraccionamiento del extracto húmico total	132
A)	Elución con agua	133
a)	Sephadex G-25	134
b)	Sephadex G-75	136
c)	Sephadex G-200	136
B)	Elución con NaOH 0,1 M	138
a)	Sephadex G-25	138
b)	Sephadex G-75	140
2.1.3.	Fraccionamiento del extracto del agua procedente de la diálisis.	147
2.1.4.	Especiación de Fe en el extracto húmico total	148
2.2.	Extracto acuoso	149
2.2.1.	Estudio del extracto acuoso sin fraccionar.	149
2.2.2.	Fraccionamiento del extracto acuoso	154
a)	Sephadex G-15	154
b)	Sephadex G-25	155
<b>V.</b>	<b>ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ÁCIDO-BASE DE LOS ÁCIDOS FÚLVICOS.</b>	<b>157</b>
<b>1.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>159</b>
1.1.	Extracción y purificación de los ácidos fúlvicos.	160
1.2.	Caracterización de los ácidos fúlvicos.	162

1.3.	Valoraciones potenciométricas .....	166
1.3.1.	Descripción del sistema .....	166
1.3.2.	Funcionamiento del sistema .....	169
1.3.3.	Obtención de datos experimentales por potenciometría .....	169
1.3.3.1	Estandarización del KOH y del HNO <sub>3</sub> .....	170
1.3.3.2	Determinación del Kw a fuerza iónica I=0,100 M ..	171
1.3.3.3	Calibración del electrodo de pH .....	173
1.3.3.4	Valoración ácido base del ácido fúlvico .....	174
2.	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>175</b>
2.1.	Valoración ácido-base de ácidos fúlvicos .....	175
2.2.	Aplicación del modelo de distribución continua .....	177
<b>VI.</b>	<b>VALIDACIÓN AGRONÓMICA DE LOS PRODUCTOS</b>	<b>181</b>
1.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>184</b>
1.1.	Evaluación sobre cítricos .....	184
1.1.1.	Ensayo de invernadero .....	184
1.1.1.1	Material vegetal .....	185
1.1.1.2	Desarrollo experimental .....	185
A)	Ubicación .....	185
B)	Condiciones Ambientales .....	185
C)	Cultivo .....	186
D)	Muestreos foliares .....	187
1.1.2.	Ensayo de campo .....	188
1.1.2.1	Material vegetal .....	188
1.1.2.2	Desarrollo experimental .....	189
A)	Ubicación .....	189
B)	Diseño experimental .....	189
C)	Tratamientos .....	190
D)	Muestreos foliares .....	190
E)	Muestreo de fruto .....	192
1.2.	Evaluación sobre melocotoneros .....	193
1.2.1.	Material vegetal .....	194
1.2.2.	Desarrollo experimental .....	194
1.2.2.1	Ubicación .....	194
1.2.2.2	Diseño experimental .....	194
1.2.2.3	Aplicación de los productos .....	195
1.2.2.4	Muestreos foliares .....	196
1.2.2.5	Muestreo de fruto .....	197
1.3.	Evaluación sobre hortalizas .....	198
1.3.1.	Material vegetal .....	198
1.3.1.1	Características del pimiento .....	198
1.3.1.2	Características del tomate .....	198
1.3.1.3	Características del pepino .....	199
1.3.2.	Desarrollo experimental .....	200
1.3.2.1	Ubicación .....	200

1.3.2.2	Experimento con pimienta	201
1.3.2.3	Experimento con tomate	202
1.3.2.4	Experimento con pepino	203
1.4.	Concentrado líquido como fertilizante férrico foliar	204
1.4.1.	Material vegetal	205
1.4.2.	Desarrollo experimental	205
A)	Cultivo	205
B)	Desarrollo experimental	207
1.5.	Tratamiento del material vegetal.	208
1.5.1.	Operaciones previas	209
1.5.2.	Mineralización.	209
1.5.3.	Determinaciones analíticas.	209
1.5.3.1	Determinación por absorción atómica	209
1.5.3.2	Determinación con autoanalizador colorimétrico.	210
1.5.4.	Análisis de fruto	210
1.5.4.1	Análisis de cítricos	210
A)	Peso y calibre de fruto	210
B)	Porcentaje de zumo	210
C)	Acidez valorable de zumo	212
D)	Determinación de sólidos solubles	212
E)	Determinación de ácido ascórbico	212
1.5.4.2	Análisis de melocotón	212
A)	Peso y calibre de fruto	212
1.5.4.3	Análisis de pepino	213
A)	Peso medio de fruto	213
B)	Contenido en sólidos solubles	213
C)	pH de la pulpa	213
D)	Firmeza de la pulpa	213
1.5.4.4	Análisis de pigmentos	213
A)	Clorofilas a y b	214
B)	Carotenos	214
1.6.	Tratamiento estadístico de los resultados	214
<b>2.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>215</b>
2.1.	Evaluación sobre cítricos	215
2.1.1.	Ensayo de invernadero	215
2.1.1.1	Parámetros de crecimiento	215
2.1.1.2	Índice SPAD	218
2.1.1.3	Análisis mineral	220
A)	Macronutrientes	220
B)	Micronutrientes	225
2.1.1.4	Efecto sobre la nutrición férrica	229
2.1.1.5	Resumen de resultados	234
2.1.2.	Ensayo de campo	235
2.1.2.1	Parámetros de crecimiento	235
2.1.2.2	Índice SPAD	236
2.1.2.3	Análisis mineral	237
A)	Macronutrientes	237

	B)	Micronutrientes	240
2.1.2.4		Índices de nutrición férrica	243
2.1.2.5		Análisis de fruto	248
	A)	Producción y Calidad de fruto	248
	B)	Análisis de calidad de zumo	250
2.1.2.6		Resumen de resultados	250
2.2.		Evaluación sobre melocotoneros	252
2.2.1.		Parámetros de crecimiento	253
2.2.2.		Índice SPAD	254
2.2.3.		Análisis mineral	255
	A)	Macronutrientes	255
	B)	Micronutrientes	257
2.2.4.		Índices de nutrición férrica	260
2.2.5.		Análisis de fruto	262
2.2.6.		Resumen de resultados	260
2.3.		Evaluación sobre hortalizas	265
2.3.1.		Experiencia con pimiento	265
2.3.1.1		Parámetros de crecimiento	265
2.3.1.2		Índice SPAD y pigmentos fotosintéticos	270
2.3.1.3		Análisis mineral	272
	A)	Macronutrientes	272
	B)	Micronutrientes	280
2.3.1.4		Influencia sobre la nutrición férrica	286
2.3.2.		Experiencia con tomate	289
2.3.2.1		Parámetros de crecimiento	289
2.3.2.2		Índice SPAD	290
2.3.2.3		Análisis mineral	291
	A)	Macronutrientes	291
	B)	Micronutrientes	297
2.3.2.4		Influencia sobre la nutrición férrica	305
2.3.3.		Experiencia con pepino	305
2.3.3.1		Parámetros de crecimiento	305
2.3.3.2		Índice SPAD y pigmentos fotosintéticos	306
2.3.3.3		Análisis mineral	306
	A)	Macronutrientes	307
	B)	Micronutrientes	308
2.3.3.4		Influencia sobre la nutrición férrica	309
2.3.3.5		Producción y calidad de fruto	310
2.3.3.6		Resumen de resultados	314
2.4.		Influencia de la aplicación foliar del Aquamato férrico sobre el cultivo del <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill var. Lydia	315
2.4.1.		Análisis de la disolución nutritiva	315
2.4.1.1		pH y conductividad	316
2.4.1.2		Contenido de macro y micronutrientes	317
2.4.2.		Parámetros de crecimiento	320
2.4.3.		Análisis mineral	322
2.4.3.1		Macronutrientes	322
2.4.3.2		Micronutrientes	324
2.4.3.3		Influencia sobre la nutrición férrica	327

2.4.3.4	Resumen de resultados .....	328
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>331</b>
1.	ADECUACIÓN DEL AQUAMATO Y FÉRRICO Y DEL DOLIRON COMO FERTILIZANTES .....	333
2.	CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO HÚMICO TOTAL DEL AQUAMATO FÉRRICO .....	336
3.	EFEECTO DEL AQUAMATO FÉRRICO SOBRE EL SUELO .....	339
4.	EFEECTO DEL AQUAMATO FÉRRICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA PLANTA .....	340
5.	EFEECTO DEL AQUAMATO FERRICO EN LA NUTRICIÓN	
6.	MINERAL .....	343
7.	EFEECTO DEL AQUAMATO FERRICO ENLA NUTRICIÓN	
8.	FÉRRICA .....	345
9.	MODELO DE ACTUACIÓN DEL AQUAMATO FÉRRICO SOBRE LA NUTRICIÓN MINERAL .....	348
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>351</b>
<b>IX.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>355</b>
<b>X.</b>	<b>ANEXO I .....</b>	<b>381</b>
<b>XI.</b>	<b>ANEXO II .....</b>	<b>391</b>



## **I. INTRODUCCIÓN**

## 1. NUTRICIÓN FÉRRICA DE LA PLANTA

### 1.1. Importancia del hierro en los cultivos

El hierro es un metal de transición que se caracteriza por poseer orbitales de vacantes, por lo que es un ácido de Lewis. En la naturaleza, se puede presentar en dos estados de oxidación Fe(II) y Fe(III). El potencial del sistema Fe(II)/Fe(III) ( $E^\circ=0,77$  volt;  $pE=13,04$ ) es bastante elevado en medio ácido, pero disminuye rápidamente al aumentar el pH por precipitar más  $Fe^{3+}$  en forma de hidróxido que  $Fe^{2+}$ .

El  $Fe^{2+}$  y el  $Fe^{3+}$  son iones relativamente pequeños y marcada propensión a formar complejos hexacoordinados con ligandos que contienen O, N y S. Esta propiedad, junto con el amplio rango de potencial redox que cubren los enzimas que contienen Fe, son razones suficientes para asociar el papel de este elemento en reacciones fundamentales desde el punto de vista biológico, como son la reducción de ribonucleótidos y dinitrógeno, o las reacciones de transferencia de electrones que caracterizan la respiración y la fotosíntesis (Mengel y Kirby, 1982; Marschner, 1986; Terry y Zayed, 1995). Al mismo tiempo, las propiedades químicas del Fe limitan su acumulación celular debido, en primer lugar, a la actuación catalítica del  $Fe^{2+}$  y el  $Fe^{3+}$  para generar radicales hidroxílicos, potencialmente los agentes más oxidantes que se conocen. Debido a la influencia del Fe en la desorganización celular, los organismos generalmente regulan su absorción, aunque también lo pueden acumular en forma de ferritina. El Fe acumulado de ésta manera no es tóxico y está fácilmente disponible para la célula (Theil, 1987).

La segunda limitación para la adquisición del Fe es la escasa disponibilidad con que este elemento se encuentra en la naturaleza. Lo hace fundamentalmente como constituyente mayoritario de polímeros oxyhidróxidos de composición general Fe-OOH que son producidos por la degradación de los minerales primarios. Como consecuencia de su elevada estabilidad y baja solubilidad a pH próximos o superiores a la neutralidad, la concentración del Fe (III) libre en condiciones aeróbicas y en sistemas acuosos se limita a una concentración en el equilibrio cercana a  $10^{-17}$  M, valor muy inferior al óptimo requerido

## I. Introducción

para el crecimiento de la planta (Guerinot y Yi, 1994). Así el problema derivado de la asimilación del Fe por los organismos no es producto de su abundancia, ya que es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, sino más por su baja disponibilidad en condiciones aeróbicas y a pH biológicos. La deficiencia del Fe en cultivos se reconoce normalmente por la clorosis o amarilleamiento intervenal en la hojas nuevas, si es severa, puede reducir la producción de los mismos e incluso a anularla completamente.

Desde un punto de vista químico, los organismos tienen tres formas para disolver los óxidos férricos: protonación, quelación y reducción. Para competir satisfactoriamente por este nutriente, los organismos han desarrollado mecanismos específicos de obtención que están basados en esos procesos químicos.

Un aspecto importante de la clorosis, es su efecto sobre la producción de cultivos, ya que el bajo aporte de Fe a la planta hace que disminuya la producción de fotosintatos necesarios para el crecimiento y desarrollo de la misma, lo cual implica una reducción de la producción (Miller y col, 1984; Mortvedt, 1991). La deficiencia mineral de Fe es característica en plantaciones de cítricos, principalmente en limoneros, donde es particularmente significativa, pues acorta el ciclo vital de las plantas, de tal forma, que la fase productiva resulta considerablemente inferior a lo normal tanto en el número de frutos como en la calidad de los mismos (Carpena y col, 1965).

En el noroeste español la superficie de cultivo afectada por la clorosis férrica cubre aproximadamente 90.000 Ha y está ocupada principalmente por árboles frutales (peral, melocotonero, almendro, cerezo, ciruelo, manzano y albaricoquero) desarrollados mediante riego por goteo. La deficiencia de hierro es actualmente el mayor problema de los cultivadores de árboles frutales, ya que se estima un gasto aproximado de 2.200 millones de pesetas al año en tratamientos de hierro de los agricultores de la zona del valle del Ebro (Sanz y col, 1992).

La clorosis férrica aparece también frecuentemente en zonas del sureste español dedicadas al cultivo de hortalizas, en las que se aplican sistemas de fertirrigación. En estos

## 1. Introducción

casos la clorosis se ve agravada, por el uso de aguas y sustratos calizos, así como otros sustratos artificiales que incluyen materiales inertes del tipo arena de cuarzo, perlita, vermiculita o fibra de coco, y otros más reactivos como turbas o subproductos industriales.

### **1.2 Disponibilidad de Fe en suelo**

Los principales factores que influyen en la capacidad de la planta para responder a las deficiencias de hierro, son la reactividad y superficie de los componentes minerales del suelo. En la mayoría de los suelos, las zonas activas predominantes son los grupos Fe-OH y Fe-OH<sub>2</sub> localizados en las superficies de los óxidos de hierro. Debido a la elevada reactividad en la superficie de la ferrihidrita, es probable que sea la fuente dominante de Fe lábil en este tipo de sistemas (Vempati y Loeppert, 1986).

Uren (1984) clasifica las distintas formas en las que se puede encontrar el Fe en suelo, en dos categorías: formas móviles e inmóviles. Las primeras, incluyen las formas hidroxiladas del Fe inorgánico FeOH<sup>2+</sup>, Fe(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup> Fe(OH)<sub>3</sub><sup>0</sup> y los complejos Fe-fulvato, mientras que define como formas inmóviles a los óxidos e hidróxidos de Fe y a las asociaciones de este elemento con la materia orgánica, fundamentalmente a los ácidos húmicos.

Este autor considera que las formas móviles son las principales constituyentes del Fe soluble y por tanto, las que puede utilizar la planta de forma inmediata. Por ello, todos los factores que afectan a la concentración de Fe soluble en el medio nutritivo también lo hacen indirectamente a la absorción de Fe por la planta. Entre los más importantes cabe destacar el pH, complejación y propiedades redox del suelo y la influencia de la baja solubilidad de los óxidos e hidróxidos presentes en el suelo.

La disolución y precipitación de los óxidos férricos controla básicamente la solubilidad de Fe en suelos. La actividad de Fe<sup>3+</sup> mantenida por estos óxidos depende del pH y del potencial redox. Según Norvell y Lindsay (1982), el denominado Fe(OH)<sub>3</sub>-suelo es el responsable de la solubilidad de Fe<sup>3+</sup> que en suelos bien aireados podría corresponder

## I. Introducción

con la ferrihidrita. La solubilidad de este hipotético mineral tiende a estabilizarse en suelos, cerca del producto de actividad iónico  $10^{-39,3}$  y puede ser expresada en el equilibrio por la ecuación:



Esta constante de solubilidad es 0,84 unidades logarítmicas menor que la correspondiente al  $Fe(OH)_3$  amorfo y aproximadamente 2,7 unidades logarítmicas más soluble que la hematita y la goethita (Lindsay, 1995), de ahí que se sugiera a la ferrihidrita como el componente de hierro del suelo, responsable de su solubilidad.

En relación al Fe orgánico soluble, los compuestos de bajo peso molecular formados por la degradación de la materia orgánica (ácidos fúlvicos), son los que principalmente contribuyen al Fe total (Lobartini y Orioli, 1988). Estos mecanismos de solubilización se estudiarán en mayor extensión en el apartado 3.4 de esta introducción.

Para terminar, hay que destacar el efecto de los ácidos orgánicos simples exudados por las raíces y los sideróforos microbianos (ácidos hidroxámicos), presentes en ecosistemas naturales, en concreto en la zona radicular. Muchos autores (Powell y col., 1980; Becker y col., 1985; Crowley y col., 1988; Piccolo y col., 1993) han subrayado su importante papel en la solubilización y transporte del Fe en planta, especialmente a partir de los complejos insolubles del Fe con las sustancias húmicas (Lindsay, 1979).

### **1.3. Eficiencia de la planta en la adquisición del hierro**

Químicamente hablando, los organismos tienen tres formas de aprovechar las formas solubles de los óxidos férricos: protonación, quelación y reducción. En condiciones de suficiencia de Fe emplean para su absorción un mecanismo de reducción de  $Fe(III)$  a  $Fe(II)$  "reductasa standard" y un transportador específico para el  $Fe(II)$ . Chaney y col., (1972) propusieron que la habilidad para reducir compuestos de Fe extracelulares era debido a la actividad de una enzima localizada en la membrana plasmática de todas las plantas. Por su

## I. Introducción

frente a la deficiencia. Existen, por el contrario, un buen número de plantas que no responden a la deficiencia, e incluso, dentro de una misma especie vegetal pueden existir cultivares eficientes y cultivares ineficientes.

En función de los mecanismos desarrollados para aumentar la disponibilidad del Fe en suelo, las especies eficientes se clasifican en dos categorías: especies con estrategia I y especies con estrategia II.

La estrategia I desarrollada en dicotiledóneas y monocotiledóneas excepto gramíneas, se caracteriza por cuatro mecanismos (Marschner y Römheld, 1995): a) disminución del pH de la rizosfera por extrusión de  $H^+$  b) reducción de Fe en la rizosfera por extrusión de reductores, tales como el ácido caféico c) aumento de la reducción de  $Fe^{3+}$  en el plasmalema de la raíz (reductasa "turbo") y d) transporte de Fe activo por la raíz mediante quelatos internos como el ácido cítrico. Estos mecanismos de respuesta están localizados en las zonas apicales y subapicales (Bell y col, 1988). La relativa importancia de estos cuatro componentes en la deficiencia de Fe para la eficiencia parece diferir en las especies de plantas y los genotipos y existen diferentes interpretaciones particularmente en el papel de los reductores y quelatos (Brown y Jolley, 1989; Chaney y Bell, 1987; Jolley y Brown, 1987).

La estrategia II es un mecanismo propio de gramíneas y se caracteriza por la liberación radicular de compuestos quelantes de Fe de bajo peso molecular denominados fitosideróforos, por analogía con los compuestos de estas características liberados por microorganismos y que se conocen como fitosideróforos (Tagaki y col, 1984; Neilands y col, 1986; Marschner y col., 1990) y por la existencia de un sistema de transporte de alta afinidad en la membrana plasmática de dichas plantas para los fitosideróforos de  $Fe(III)$ .

Presumiblemente estos agentes enlazan el  $Fe(III)$  insoluble y lo convierten en quelatos de  $Fe(III)$  solubles que transportan el Fe hacia el exterior de las células radiculares por un sistema de transporte específico para los sideróforos férricos ( $Fe(III)$ -MAs) y en particular en la zona apical de la raíz (Tagaki y col., 1984, Marschner y col., 1986, 1987).

## *L. Introducción*

parte, Bienfait (1985) formuló un modelo en el cual se diferenciaban dos tipos de sistemas redox en la membrana plasmática, el denominado sistema "standard" y el "turbo". El primero tiene la capacidad de reducir aceptores externos de electrones con alto potencial redox como el  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  y posiblemente oxígeno, que podría ser considerado el aceptor de electrones natural. Entre otros procesos parece estar involucrado en la regulación del potencial de membrana y en la producción de especies activas de oxígeno. El sistema "standard" es un constituyente de todas las plantas y no es capaz de reducir compuestos Fe-quelato, ya que poseen potenciales redox más bajos. El otro sistema mencionado, el "turbo", se trata básicamente de una reductasa transmembrana, que es inducida en deficiencia de Fe. Se localiza en la epidermis de las raíces jóvenes. Este enzima reduce tanto el  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , como los quelatos de hierro presentes en el exterior de las células, con electrones provenientes del NADPH citoplasmático. Biológicamente incrementa la concentración del  $\text{Fe}^{2+}$  en la superficie celular para facilitando así su absorción por las raíces.

Existen hechos experimentales que confirman la presencia de al menos dos sistemas redox diferentes capaces de reducir quelatos de Fe, o dos estados de un mismo sistema con un diferente comportamiento en luz y en oscuridad (Tisserat y Manthey, 1996; De la Guardia y Alcántara, 1996), pero no ha sido posible aislar, ni purificar ningún sistema quelato reductasa de la membrana plasmática (Moog y Brüggemann, 1994). Susín y col. (1996) postulan que este sistema "turbo" no ha sido aún identificado debido a que durante el proceso de extracción y purificación de la membrana plasmática se pierde un cofactor necesario para que la reductasa "turbo" actúe. Sin embargo, existen autores (Holden y col., 1991; Buckhout y col., 1989; Brüggemann y col., 1990; Moog y Brüggemann, 1994) que cuestionan que la "reductasa turbo" sea inducida por la deficiencia de Fe en el medio, sino que ésta se encuentra tanto en raíces de plantas cultivadas bajo deficiencia de Fe o bajo un aporte normal de éste elemento, pero en las primeras aumenta la actividad de la misma.

En relación a su capacidad para responder a la deficiencia de hierro, las plantas superiores pueden dividirse en eficientes y no eficientes, (Jolley y Brown, 1987). Las eficientes pueden activar los mecanismos enzimáticos anteriormente descritos y actuar

## **I. Introducción**

En las plantas con estrategia II, la velocidad de liberación de estos fitosideróforos inducidos bajo la deficiencia de Fe es un parámetro apropiado de caracterización genética de diferencias en las distintas especies de planta e incluso entre cultivares dentro de una misma especie (Römheld y Marschner, 1990).

### **1.4. Métodos de diagnóstico de la clorosis férrica**

De acuerdo con Carpena y col (1976), no es posible evaluar eficazmente los tratamientos correctores sin un método de diagnóstico adecuado. Para determinar correctamente el estado nutritivo férrico de una planta son necesarios métodos eficaces de diagnóstico. En experiencias de cultivo controlado (hidroponía en invernadero), la mayor parte de los métodos de diagnóstico se correlacionan bien con los síntomas de clorosis (Manzanares, 1991), si embargo, su extrapolación a condiciones de campo no resulta normalmente satisfactoria.

Los métodos visuales sólo son aplicables cuando el grado de deficiencia es elevado y no existen deficiencias de otros micronutrientes. La deficiencia de Fe es fácil de reconocer entre las de los micronutrientes ya que produce un tipo de clorosis característico que sólo en el caso del Mn puede llevar a una cierta confusión (Loue, 1986). Otro método de diagnóstico visual común es el denominado método biológico, que consiste en inyectar hierro en peciolo, zona intervenal de las hojas o directamente en el tronco, y esperar la respuesta de estos órganos, que suele ser rápida e inequívoca en el caso de que exista deficiencia de hierro (Heras, 1961).

Uno de los principales efectos de la deficiencia de Fe es la reducción del contenido de tilacoides del cloroplasto (Nishio y col., 1985), lo que produce una reducción en el contenido de clorofilas, carotenoides y transportadores de electrones por unidad de área (Abadía y col., 1989; Val y col., 1987). La pérdida de pigmentos foliares en condiciones de deficiencia no implica, si embargo, que las hojas disminuyan su capacidad para captar la energía luminosa (Terry y Zayed, 1995), debido en parte al incremento producido en la relación foliar de caroteno/clorofila. También se ha demostrado en diferentes cultivos



## I. Introducción

sujetos a condiciones de deficiencia un incremento en la relación clorofila a/clorofila b (Abadía y col., 1991; Monge y col.; 1987; Nishio y col., 1985). Este incremento es mayor en condiciones de campo que en condiciones de cultivo controlado. Una explicación dada a este incremento es que en condiciones de deficiencia de hierro existe una fotodestrucción preferentemente en las clorofilas b (Díez, 1959).

El análisis mineral de un elemento, principalmente en hoja, suele reflejar el estado carencial o tóxico de dicho nutriente en planta. No obstante, el contenido total de Fe puede no reflejar el estado nutritivo de la planta, dependiendo de las causas que originen la clorosis. Cuando esta es producida por un aporte bajo de Fe, la concentración de dicho elemento en hoja refleja por sí mismo el estado nutritivo (El-Sherif y col., 1984), mientras que en plantas desarrolladas con suficiente Fe, pero en condiciones desfavorables, el contenido de Fe en hojas cloróticas suele ser superior al de hojas verdes (Abadía y col., 1989). Esta aparente paradoja puede ser motivada por la inmovilización de Fe dentro de la planta, que impediría su transporte a las hojas jóvenes, de forma que se plantee la existencia de formas activas y no activas de Fe en planta.

Por otro lado, la deficiencia de un elemento puede afectar a la concentración en planta de otros elementos, por lo que la relación entre sus concentraciones puede ser un índice del estado nutritivo del cultivo. Entre las relaciones más utilizadas para estimar el estado férrico se incluye la Fe/Mn, cuyo equilibrio en planta se considera más importante que la cantidad límite de cada uno de ellos (Hernando y Casado, 1974). De acuerdo con Zaharieva y col. (1988, 1995) el Fe interfiere la absorción de Mn, mientras que este último incide en la nutrición férrica a nivel metabólico produciendo la inactivación del Fe.

Valenzuela y col., (1995) definieron un índice de Fe que relaciona las concentraciones de P, K y Fe de acuerdo con la ecuación (2)

$$Fe\ index = \frac{50\ (10P + K)}{Fe} \quad (2)$$

## 1. Introducción

donde P y K son las concentraciones de estos elementos en tanto por ciento (%) de materia seca y la concentración de Fe viene referida a  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de materia seca. Los autores sostuvieron que un incremento en el índice de Fe podría ser usado como indicador de la deficiencia de Fe, aunque los valores críticos pueden diferir de una especie a otra (Guzmán y col., 1991) y del estado fisiológico de la hoja (Valenzuela y col., 1991).

### **1.5. Corrección de la clorosis férrica**

Existen en la actualidad dos tendencias en orden al modo de solventar el problema de la clorosis férrica. Una de ellas postula la mejora genética de los cultivos para disminuir su susceptibilidad a esta deficiencia (Hintz y col., 1987), mientras que la segunda sería partidaria de su corrección mediante la adición de fertilizantes.

La mejora genética frente a la clorosis férrica implica la consecución de genotipos "eficientes en Fe" (Cianzo, 1995), que de acuerdo con Alcántara y de la Guardia (1987) es posible a partir de la obtención de variedades con resistencia uniforme a la clorosis mediante la selección a través de distintas generaciones.

En la práctica, el método más extendido para corregir la clorosis férrica es la utilización de fertilizantes, y entre los más utilizados destacan los complejos de Fe. Estos se pueden dividir en naturales y sintéticos en función de su procedencia. Los complejos naturales proceden de productos de biodegradación o que han sufrido ciertas alteraciones industriales. Destacan los poliflavonides y lignosulfatos, derivados de industrias madereras y ricos en azufre y polifenoles. Su uso se ha mostrado ineficaz, dada la baja estabilidad de los complejos formados (Lucena, 1990), pero su aplicación foliar en una formulación adecuada, puede hacer desaparecer los síntomas cloróticos. Los complejos férricos con aminoácidos y humatos o fulvatos son poco estables y no pueden explicar una mayor absorción de Fe, pero se observan efectos beneficiosos tras la aplicación de alguno de estos compuestos. Pérez-Sanz y col. (1997) estudiaron la incidencia de un extracto de algas enriquecido con ácidos fúlvicos y vitaminas sobre el crecimiento y producción de melocotón y cítricos. Si bien, los compuestos no fueron capaces de recuperar especies sensibles en

## **I. Introducción**

condiciones de clorosis severa, la producción se mejoró en valores próximos a los obtenidos por el Fe-EDDHA, incluso cuando los síntomas de clorosis eran evidentes.

Dado que estos quelatos naturales presentan características más acordes con la conservación del medio ambiente que los quelatos sintéticos, este tipo de fertilizantes naturales podría ser evaluado como alternativa a la utilización de compuestos de síntesis.

## **2. UTILIZACIÓN AGRÍCOLA DE SUBPRODUCTOS ORIGINADOS EN PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS**

### **2.1 Concepto de biosólido**

La Unión Europea produce cerca de 6,5 millones de toneladas de lodos de depuración por año expresados en materia seca (Hall, 1995), de los cuales a España corresponden 350.000 toneladas. Con la entrada en vigor de la Directiva Europea sobre depuración de aguas, se espera que en el año 2005 se produzcan 10 millones de toneladas de lodos.

Existen básicamente dos tipos de plantas de tratamiento de aguas: las plantas potabilizadoras y las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Tras el proceso de depuración además del agua tratada se origina un residuo sólido. Este material es muy heterogéneo y su composición depende, tanto de la naturaleza del agua a tratar, como de la tecnología y reactivos utilizados en la depuración o potabilización, e incluso de la época del año en que se lleva a cabo (Terry y col., 1979).

Tradicionalmente, los lodos han sido depositados en vertederos municipales, incinerados, vertidos al mar o aplicados directamente a suelos agrícolas. Esta última alternativa parece ser la que más interés está despertando, dadas las características de los lodos, principalmente su alto contenido en materia orgánica cuya falta es uno de los principales factores limitantes de los suelos agrícolas españoles. Estas propiedades pueden

## **I. Introducción**

ser mejoradas mediante los procesos de estabilización y secado, en función del uso final al que sean destinados. Actualmente se ha incorporado el término biosólido para definir a los lodos tratados y que pueden ser reutilizados en función del pretratamiento, y entre otros fines, como enmienda orgánica, material de sellamiento de vertederos o fertilizantes.

El interés en desarrollar la aplicación de biosólidos radica por una parte, en colaborar con los objetivos de una agricultura sostenible, a través de la mejora de calidad del suelo y la mayor producción de alimentos gracias al uso de una fertilización racional. Por otro lado, la mejora en la conservación del medio ambiente haciéndola compatible con la explotación agrícola ha dado lugar en nuestros días a un importante desarrollo de nuevos materiales con fines agronómicos específicos. Ambas finalidades se intentan conciliar mediante la investigación del posible uso de subproductos del tratamiento de aguas en agricultura.

### **2.2. Características de los productos biosólidos**

Podría afirmarse que la materia prima en la fabricación de productos biosólidos es el lodo, siendo la estabilización y el secado el proceso real de fabricación del biosólido. Durante este proceso se modifican las características de los productos retirados de las aguas, con la finalidad de reducir su potencial de fermentación y hacerlos más inertes, de forma que puedan incorporarse al medio ambiente en condiciones adecuadas. La estabilización puede realizarse en reactores aerobios, anaerobios o mediante la adición de reactivos químicos. Este procesamiento necesariamente influye en el aspecto del producto final, y con ello en su aceptación por el público, en el olor, en su contenido en patógenos, en su contenido en nitrógeno, fósforo, potasio, carbonato y metales. Ello determinará, asimismo, cuándo y cómo debe ser almacenado y usado, así como las restricciones en su uso final.

En la tabla 1 se describen de forma resumida los biosólidos más utilizados en agricultura, así como sus procesos de estabilización, forma de aplicación en el terreno y principales ventajas e inconvenientes (Walker, 1994).

## I. Introducción

El coste de fabricación de productos biosólidos es generalmente mayor con el incremento de los procesos de tratamiento y secado, aunque también lo es la amortización, gracias a sus numerosas aplicaciones posteriores y a la mayor aceptación del producto como consecuencia de la mejora en su presentación. Los gastos de transporte son superiores en productos líquidos que en los deshidratados y secados con calor, por lo que estos últimos son los biosólidos más sencillos de almacenar y transportar. Por último, hay que indicar que el coste en infraestructura en la digestión anaerobia requiere mayor inversión que la necesaria para producir la digestión aeróbica o la estabilización alcalina.

Una de las aplicaciones más extendidas de los biosólidos es la producción y mantenimiento de praderas, en semilleros o como sustrato hortícola, por su fácil y amplia aceptación por el público y favorable acogida comercial. En los años ochenta se inició la utilización de la estabilización alcalina como método de eliminación de patógenos y de estabilización de la materia orgánica, utilizando a tal fin una combinación de incremento de pH, calor y secado (Logan y Burham, 1995). Los biosólidos estabilizados alcalinamente se usan en agricultura y recuperación de suelos degradados, pero también como suelo artificial y en sellamiento de vertederos. Los productos secados al calor son costosos de producir, pero son los fertilizantes más efectivos, contienen la menor cantidad de agua y con frecuencia son usados como relleno de fertilizantes químicos o como fertilizantes de macizos, setos y cultivos de cítricos.

### **2.3. Valor nutricional de los biosólidos**

Los biosólidos divergen ampliamente en sus propiedades químicas, físicas y biológicas; atendiendo a numerosos factores como la fuente y composición del lodo, sistema de tratamiento, extensión para la cual el material es digerido y estabilizado y como sea tratado el material entre su procesamiento y aplicación al suelo. Ya hemos indicado que los biosólidos se originan mayoritariamente a partir de lodos procedentes de plantas de tratamiento de aguas, tanto potabilizadoras, como residuales. Por lo que su aplicación en agricultura se basa en las cualidades de los lodos, especialmente en su alto contenido en materia orgánica.

La razón primordial para fomentar el uso de lodos en agricultura ha sido su valor nutritivo aunque generalmente son considerados una fuente baja de nutrientes. Se ha trabajado mucho para elucidar los efectos de los lodos sobre la nutrición vegetal, pero este efecto es difícil de predecir, dado que en la aplicación influye tanto la calidad de los lodos, como las condiciones en las que son utilizados. Los nutrientes de los lodos, excepto cuando participan en la composición de fertilizantes comerciales, no están equilibrados para suplir los requerimientos de los cultivos (Elliot, 1986).

Para Oberle y Keeney (1994) las diferencias en la disponibilidad de los nutrientes de los distintos tipos de lodos son generalmente referidas a las diferencias en la composición del lodo y en particular al sistema suelo-clima-forma de aplicación. Para asegurarnos una fertilización equilibrada, las relaciones de aplicación del lodo deben reflejar: la capacidad inherente del suelo para aportar nutrientes, cualquier otra fuente externa capaz también de aportar nutrientes (por ejemplo, fertilizantes comerciales, estiércoles o residuos vegetales...) y las necesidades específicas del cultivo. Todos estos factores permiten asegurar la existencia de cantidades de nutrientes suficientes para suplir las necesidades nutricionales del cultivo, al tiempo que no se alcanzarían niveles potencialmente tóxicos.

Las aplicaciones deberían realizarse cuando la disponibilidad de los nutrientes del lodo coincida con las necesidades del cultivo. Permitiendo de este modo minimizar cualquier impacto medioambiental negativo asociado con la pérdida de nutrientes y que afectaría, tanto a aguas superficiales, como subterráneas. Ha de tenerse también en cuenta que cuando el lodo es aplicado en suelos en momentos erróneos, debido al elevado contenido en sales de muchos de ellos, puede inhibir el crecimiento del cultivo (Keeney y col., 1975)

Sommers (1977) estimó el contenido de nutrientes de los lodos en unos intervalos de considerable variación. El N total lo situó de  $<1$  a  $170 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , para el  $\text{NH}_4\text{-N}$  de 5 a  $67600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  y el  $\text{NO}_3\text{-N}$  entre 2 a  $4900 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Con relación al P total sugirió valores entre 1 a  $150 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  y para el K inferiores a 0,5 y nunca superiores a  $25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Las concentraciones de nutrientes no deberían modificarse con el tiempo una vez estabilizados.

## I. Introducción

**Tabla 1** Empleo en los productos biosólidos más utilizados (Walker, 1994)

Productos biosólidos	Estabilización	Características				
		N (%)	Forma de aplicación en agricultura	Uso final	Ventajas	Desventajas
Líquidos	Digestión aeróbica	3 a 9	Inyectado o superficie aplicado como líquido	Líquido fertilizante sobre pastizales, forrajeros, bosques y recuperación	Bajo coste de producción, altos contenidos en N, puede ser almacenado en lagunas, los procesos anaeróbicos producen rendimiento energético	Alto coste de transporte; potencial mal olor, presenta restricciones en su manejo; el proceso aeróbico usa energía
	Digestión anaeróbica	3 a 7				
	Estabilización alcalina	2 a 4				
Deshidratado	Digestión aeróbica	2 a 5	Inyectado humedecido o aplicado en superficie como pastel	Fertilizante sobre pastizales, forrajeros, bosques y recuperación	Menos coste de transporte; se aplica en cobertera o inyectado humedecido; rendimiento energético por el proceso anaerobio.	Mayor coste para deshidratarlo; potencial mal olor; restricciones en su manejo; consumo energético por el proceso anaerobio
	Digestión anaeróbica	2 a 5				
	Estabilización alcalina	1 a 3				
Seco al aire	Digestión aeróbica	2 a 4	Fácil de manipular y extender	Fertilizante sobre pastizales, forrajeros, bosques y recuperación	Menos coste para deshidratarlo; fácil de almacenar y obtener una aplicación uniforme	Requiere más espacio y tiempo para deshidratarlos y dependen del clima; restricciones en su manejo
	Digestión anaeróbica	2 a 4				
	Estabilización alcalina	1 a 3				
Tratamiento alcalino	Procesado con kilt dust	1 a 2	Con cal como agente mojante	Como agente encalante o para cubrir diariamente vertederos	Relativamente barato; provee nutrientes y caliza	Altos contenidos en lime, a veces no deseables; mal olor cuando son procesados o se almacenan
	Sin kilt dust	1 a 2				
Compostado	Procesos varios de agitación y aireación estática sistemas abiertos y cerrados	1 a 2	Fácil de almacenar y manejar, aspecto de turba	En recuperación de suelos degradados, horticultura, paisajismo y semilleros	alta aceptación pública del producto; sustituye a las turbas con liberación lenta de nutrientes, fácil de manejar y almacenar	Procesos asociados son el olor y los bioaerosoles; relativamente caro de producir.
Secado con calor	Secado por procesos de calentamiento directo e indirecto, y evaporación	2 a 10	Sólido en forma de tabletas	Utilizado preferentemente en bajas cantidades como fuente o transportador de nutrientes en fertilizantes químicos	Altos contenidos de N; fácil de almacenar y usar.	Deben mantenerse secos cuando son almacenados; fuerte olor si son productos primarios de la combustión; producción relativamente cara

## I. Introducción

El N en el lodo empieza a estar disponible por los procesos de nitrificación, desnitrificación, inmovilización, volatilización y mineralización en el ciclo del N con posterioridad a la aplicación del lodo (Pięrzynski, 1994). La nitrificación es un proceso aerobio donde el  $\text{NH}_4\text{-H}$  se convierte a  $\text{NO}_3$ ; la desnitrificación es un proceso anaerobio donde el  $\text{NO}_3\text{-N}$  se convierte en el N gaseoso; la inmovilización se refiere al uso de las formas inorgánicas por los microorganismos del suelo de tal forma que el N inorgánico no esta disponible largo tiempo para la planta. Por último, en los procesos de volatilización y mineralización se producen las pérdidas de N como  $\text{NH}_3$  y la conversión de N como  $\text{NH}_4\text{-N}$ , respectivamente.

Uno de los principales objetivos en la aplicación agrícola de los lodos, es el cálculo de N que va a estar disponible inmediatamente después de la aplicación, es decir predecir el N disponible que será mineralizado. Es un objetivo difícil y con frecuencia se usa un valor denominado PMN (N potencialmente mineralizable). La producción de  $\text{NO}_3$  y  $\text{NH}_4^+$  con el tiempo o la medida de la evolución del  $\text{CO}_2$  son indicadores de la mineralización. El PMN depende de factores como el tipo de suelo, temperatura y contenido de humedad del suelo. Este valor también depende del tipo de lodo y el método de procesamiento. García (1990) estimó que el 5-10 % de N puede considerarse inorgánico y de asimilación inmediata por las plantas; el resto corresponde a N orgánico, cuya mineralización para pasar a forma disponible necesita un cierto tiempo y en este proceso participan activamente los microorganismos del suelo.

Dentro de las principales desventajas del aporte de N en cultivos mediante la aplicación de los lodos, se encuentra la posibilidad de lixiviación de nitratos, incluso pasado bastante tiempo desde que se realizó aquella. La mineralización del N se produce cuando las condiciones del suelo lo favorezcan y no siempre coinciden con la demanda del cultivo. Por esta razón se pueden producir pérdidas de nitratos que pueden afectar a las aguas subterráneas. Este problema se puede reducir planificando la aplicación de los lodos en función de las necesidades de N del cultivo, de forma que se minimicen las pérdidas por nitratos (Keeney, 1982).



## I. Introducción

El P existe en los lodos, tanto en forma orgánica como inorgánica, aunque generalmente predominan las formas inorgánicas. El P orgánico debe mineralizarse en los suelos antes de que el P esté disponible para ser absorbido por la planta, de forma similar al N, si bien estos procesos todavía no han sido objeto de mucha atención en la investigación porque las relaciones de P son generalmente mucho mayores que las necesidades de los cultivos (Pierzynsky, 1994). El desequilibrio entre el N y el P en lodos puede causar un incremento sustancial de los niveles de P en suelo, con frecuencia a niveles mucho mayores que el P adecuado para la nutrición de cultivos, y puede incrementar la movilidad de este elemento, con consecuencias negativas en aguas superficiales.

Dadas las características de adsorción del fósforo orgánico, se postula que aplicaciones que presenten cantidades de fósforo elevadas podrían contribuir significativamente a la vulnerabilidad de la zona (Lemunyon y Gilbert, 1993). Sugiriéndose que la aplicación debe basarse en el contenido en P más que el de N, compensando de esta forma el incremento de P en suelo que es común en aplicaciones de lodos a largo plazo. Esta forma de actuación presenta el inconveniente de incrementar de manera importante la cantidad de terreno requerido para depositar una cantidad dada de lodo.

Generalmente se considera a los lodos como fuentes pobres de K. El potasio es un constituyente soluble en lodos, nunca se en concentraciones superiores a  $10 \text{ g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ . Está generalmente aceptado que el 100% del K en lodos es asimilable (Pierzynsky, 1994)

La aplicación de lodos al suelo puede disminuir, incrementar o no afectar al pH del suelo. Según Pierzynsky (1994), la mineralización del carbono orgánico y N, la nitrificación de las formas amoniacales del N, la hidrólisis de los compuestos de Fe y Al, y la oxidación del sulfuros son factores que pueden disminuir el pH del suelo. Por el contrario, puede ser incrementado por la inclusión de cal procedente de los procesos de tratamiento del lodo. En áreas donde la acidez del suelo es problemática puede ser beneficioso la aplicación de lodos para incrementar el pH a niveles deseables, y mejorar con ello la capacidad tampón del suelo.

### **2.4. Inconvenientes del uso de biosólidos**

#### **2.4.1. Elementos traza**

El riesgo potencial en la cadena trófica de los elementos traza presentes en biosólidos aplicados a agricultura ha sido intensamente estudiado en los últimos 25 años. Durante este periodo, la barrera suelo planta se ha considerado fundamental para proteger a la fauna que habitaba en áreas cercanas a las de aplicación de biosólidos. Actualmente se sabe que la adsorción o precipitación de metales en suelos o raíces limita la traslocación al tallo de la mayoría de los elementos, y en el caso de que se pudiera producir esta traslocación, la fitotoxicidad del Zn, Cu o Ni puede reducir el contenido de metales en tallo a niveles crónicamente tolerables. Las relaciones entre los elementos traza presentes en los lodos parecen más importantes que los contenidos individuales de cada uno, pues se pueden producir interacciones que reduzcan su disponibilidad. Los procesos de adsorción, quelación o precipitación en los que se ven involucrados los lodos pueden ocasionar la retención de las trazas metálicas incluso en casos de ingesta por el ganado (Chaney, 1994).

Un ejemplo de interacción que reduce el riesgo de la toxicidad de Cd es la relación 1:100 Cd/Zn. Esta proporción debe alcanzarse en biosólidos mediante el apropiado pretratamiento industrial. Aunque en cultivos desarrollados sobre suelos ácidos se favorece la absorción de niveles altos de Cd y Zn, la presencia de Zn reduce el riesgo potencial del Cd en los cultivos. La fitotoxicidad del Zn sirve como límite natural máximo de Cd en cultivos. Incluso el Zn en planta puede inhibir la absorción del Cd en animales, cuando éstos ingieren plantas con niveles elevados de este elemento (Mc Kenna y col., 1992). Además del Zn existen otros elementos que pueden disminuir la traslocación del Cd como es el Mn. El aporte de Mn en disolución nutritiva por encima del nivel normal implica una reducción en la concentración del Cd en parte aérea de lechuga, así como de su contenido relativo en cloroplasto (Ramos, 1994). Estos factores reducen significativamente el riesgo de contaminación de Cd proveniente del biosólido, comparado con el estimado en los estudios toxicológicos a través de las sales de Cd.

## I. Introducción

La presencia de  $\text{CaCO}_3$  en los biosólidos puede causar deficiencia de Mn. Chaney y col., (1994) estudiaron si la adición deliberada de Fe y Mn a los lodos reducía la absorción de Cd y prevenía la deficiencia de Mn en lechugas (*Lactuca sativa* L.) cultivadas en suelos que habían sido enmendados con lodos contaminados con Cd en los años setenta. No se observaron efectos aparentes de la adición de Fe y Mn sobre la absorción de Cd, motivados fundamentalmente por que la existencia de óxidos de Fe y Mn adsorbían el Zn, reduciendo su habilidad para inhibir la absorción de Cd por la lechuga.

Ocasionalmente los biosólidos contienen niveles elevados de Cd, Mo, Zn, Pb, Cu o bifenilos policlorados (PCBs) (Chaney y col., 1991) por lo que no deberían ser utilizados en aplicaciones al suelo. Aunque se consideraba que la biodisponibilidad del Cd es un 100%, Chaney y Ryan (1993) concluyeron que esta biodisponibilidad es mucho menor apoyándose en resultados obtenidos por la aplicación de biosólidos con contenidos en Cd de 21 Kg Cd·Ha<sup>-1</sup> sobre trigo (*Triticum aestivum* L.), soja [*Glycine max* (L.) Merr], cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) El grano no superó concentraciones de 0,1 mg Cd·kg<sup>-1</sup> incluso en suelos muy ácidos.

De los elementos traza presentes en biosólidos, parece que sólo el Hg como metil mercurio puede ser biomagnificado, pero este metal se encuentra en concentraciones muy bajas en lodos aptos para usos agrícolas (Chaney, 1994).

Otro ejemplo de éste fenómeno de interacción entre elementos fue descrito por Chaney (1994) y se refiere a la toxicidad en ganado por Zn procedente de biosólidos. Los animales con deficiencias de Cu son más sensibles a la toxicidad del Zn que aquellos que ingieren cantidades satisfactorias de Cu en la dieta. Dado que los biosólidos aplicados en agricultura generalmente no presentan bajos contenidos de Cu, se debería contrarrestar la toxicidad del Zn como hemos indicado. De forma análoga, la toxicidad de Cu en rumiantes es sustancialmente reducida cuando se incrementa el nivel de Zn, Cd, Fe, Mo o S en la dieta. En contraste, sí se produce toxicidad de Cu cuando se ingieren biosólidos donde la concentración exceda a 1000 mg Cu·Kg<sup>-1</sup>.

## I. Introducción

Chaney y Ryan (1993) estudiaron el potencial de absorción de la planta para permitir la transferencia del elemento traza desde el biosólido a la cadena alimenticia. En experimentos realizados en tiestos se observa que la absorción de un elemento contaminante es superior a la que se obtiene en campo para una dosis dada del elemento en suelo, por tanto ni el invernadero, ni las cámaras de cultivo deben utilizarse para estimar las curvas de acción. Desafortunadamente, solamente un pequeño número de los ensayos de campo se desarrollaron siguiendo criterios de la "buenas prácticas" en la utilización de biosólidos. Está claro que en suelos muy ácidos, la planta incrementa la absorción de Zn, Cd, Ni, Mn y Co y se incrementa la potencial fitotoxicidad del Cu, Zn y Ni; cuando el pH del suelo es alcalino, se incrementa la absorción de Mo y Se, mientras el Pb y Cr no se absorben significativamente.

Cuando los cationes metálicos están fuertemente adsorbidos, la concentración del metal en la planta respecto a la dosis se aproxima a un meseta, lo que parece indicar que el elemento contaminante no se transfiere tan fácilmente a la planta. Se debe considerar que la comparación entre las dosis de aplicación solamente es válido después del periodo de biodegradación rápida de la materia orgánica presente en los biosólidos aplicados. Si las dosis aplicadas son elevadas, la adsorción se puede extender varios años debido a la formación de subproductos originados por la degradación del biosólido que incrementan la difusión del metal y la convección a las raíces. El efecto es más significativo para plantas de la familia de las *Poaceae* que en otras especies, según Chaney (1994) debido al papel de los fitosideróforos. Además, el pH del suelo debe ser el mismo en todas las dosis estudiadas. Y por último, la concentración del metal en el biosólido afecta la pendiente de la curva de acción de forma que cuanto mayor sea la concentración del metal, mayor será la fitodisponibilidad (Jing y Logan, 1992).

Mc Bride (1995) establece que, aunque la capacidad de adsorción de metales por parte del suelo se vea incrementada con la materia orgánica aplicada, la mineralización de ésta a lo largo del tiempo produce el tránsito de los metales a formas más solubles al descomponerse el lodo. Si bien no se discute que exista una concentración máxima en planta durante la aplicación de lodos, sí se pone en duda que ese valor se mantenga después

## **I. Introducción**

de su adición al suelo ya que la cantidad disponible de metales se incrementa y manifiesta un comportamiento de acuerdo con una isoterma de Langmuir. Siguiendo a Chaney (1994) la mayoría de los metales traza presentes en biosólidos apropiadamente pretratados no pueden causar efectos adversos a humanos, ganado, plantas o medio natural cuando se aplican  $> 1000 \text{ Mg} \cdot \text{Ha}^{-1}$ . Las limitaciones naturales sobre la absorción de metales y la biodisponibilidad, incluyendo la respuesta asintótica, previenen que se alcancen los niveles tóxicos. Muchos biosólidos tienen baja presencia de diferentes elementos, y sólo unos pocos de ellos implican riesgo. El análisis regular de los biosólidos provee suficiente información para prevenir de los efectos adversos de los elementos traza sobre la cadena trófica.

### **2.4.2. Presencia de compuestos tóxicos orgánicos**

En general existen compuestos orgánicos tóxicos en los lodos en un intervalo de concentración de miligramo por kilogramo, por lo que algunos autores no los consideran compuestos de riesgo en la aplicación de lodos (O'Connor, 1994). Este mismo autor sostiene que la mayoría de los compuestos orgánicos son fuertemente retenidos en la matriz del lodo, por lo que presentan baja disponibilidad para la planta, y en caso de que se produjera su acumulación en planta, lo harían en muy baja proporción.

Debe considerarse que la asociación íntima entre los diferentes constituyentes del suelo puede determinar el comportamiento adsorptivo de los agregados del suelo. Así por ejemplo, la presencia de precipitados de hidróxido férrico y materia orgánica sobre montmorillonita puede incrementar la superficie específica del suelo pero reducir la adsorción de herbicidas como el thiazafluron (Celis y col., 1997).

Es importante estudiar la influencia del C orgánico sobre los procesos adsorptivos de estos compuestos orgánicos a fin de conocer el destino y transporte de los contaminantes orgánicos. En la bibliografía consultada se encontraron algunos modelos de comportamiento para contaminantes concretos en aguas (Patterson y col., 1996) y suelos (Onken y Traina, 1997).

## **I. Introducción**

Pueden identificarse ciertos riesgos para el medio ambiente, sobre todo en el caso de compuestos orgánico lipofílicos. Entre estos riesgos cabe señalar el consumo humano de carne obtenida de animales alimentados por forraje tratado con lodos; el consumo de la biota de los suelos tratados con lodos por depredadores; y la presencia de seres humano que vivan en áreas de acumulación o aplicación de lodos y se expongan al aire o beban agua o coman peces de las aguas superficiales. Sin que deban olvidarse otro tipo de prevenciones en su utilización, por ejemplo, para evitar la ingestión directa del lodo por los niños.

Revisten riesgo los policloruros de bifenilos (PCBs) y otros compuestos orgánicos tales como: a) dibenzo p-dioxinas cloradas (CDDs) y dibenzofuranos (CDFs) y b) surfactantes aromáticos. Aunque existen en concentraciones muy bajas (microgramo por kilogramo), son extremadamente tóxicos (O'Connor, 1994).

La utilización de estiércoles y lodos procedentes de EDAR han revelado concentraciones de hormonas esteroides suficientes para afectar al crecimiento de la alfalfa y a la trucha, revistiendo riesgo sobre el sistema endocrino humano (Shore y col., 1997).

### **2.4.3 Patógenos**

La presencia de patógenos en lodos, y su capacidad de supervivencia después de la aplicación al suelo, ha sido uno de los inconvenientes que más atención ha recibido. También ha sido tema de interés el movimiento de éstos a través de la superficie del suelo y las aguas subterráneas. Una de las funciones primordiales de los tratamientos de aguas es la eliminación o reducción de las poblaciones de patógenos en lodos y aguas. Esta reducción depende exclusivamente del tipo de tratamiento aplicado y de los organismos presentes en el lodo. Generalmente se observan reducciones superiores a un 90%, eliminándose sobre todo las bacterias patógenas. Los virus y parásitos, sin embargo, sólo sufren reducciones próximas al 50% durante el tratamiento primario, y algo ligeramente superior en el tratamiento secundario (Farrah y Bitton, 1990). Para su eliminación total se requiere un tratamiento terciario (Farrell y Stern, 1975).

## **I. Introducción**

La USEPA clasifica los lodos en dos grupos, según el número de patógenos y microorganismos contenidos en los mismos (Angle, 1994). Los lodos clasificados como clase A presentan un contenido de coliformes fecales inferior a 1000 por gramo, menos de tres *Salmonella* sp por gramo, menos de un huevo de lombriz por cuatro gramos y menos de un virus entérico por cuatro gramos. Estos pueden ser utilizados para cualquier finalidad. Los residuos clase B presentan un contenido superior de patógenos y pueden ser aplicados en suelo, aunque sujetos a numerosas restricciones.

Los lodos de clase A se obtienen después de someterlos a tratamiento terciario que incluye procesos tales como el compostaje, secado con calor, tratamiento calorífico, estabilización alcalina, digestión termofílica, radiación beta y gamma y pasteurización.

La legislación española no contempla esta clasificación pero especifica que deben estar exentos de microorganismos infecciosos, considerándose, si los hubiere, residuos tóxicos y peligrosos, con lo que no podrían ser utilizados en agricultura.

### **2.5 Usos especiales en la aplicación de biosólidos**

La aplicación de biosólidos en grandes cantidades ha mostrado resultados positivos en reforestación, recuperación de suelos degradados, en parques públicos y jardines, así como en cultivos hortícolas.

Su utilización en bosques es una técnica de eficacia probada para agilizar el crecimiento de árboles, principalmente en ejemplares jóvenes, por lo que se recomienda su uso en reforestación. (Cole y col., 1986; Henry y col., 1993). Además de su efecto beneficioso sobre los plantones, destaca la mejora de calidad del suelo que incide sobre la vegetación de la zona. En principio este efecto podría tener carácter beneficioso, sin embargo, es un hecho demostrado que la aplicación de biosólidos en grandes dosis incrementa sustancialmente el contenido en  $\text{NO}_3^-$  de las aguas subterráneas (Riekirk y Cole, 1976; Vogt y col., 1980). Tampoco están descritos en la bibliografía, los efectos de los biosólidos sobre los individuos del ecosistema, en los que habría que incluir los

## I. Introducción

microorganismos del suelo, plantas y animales.

Debido a las características geográficas, las zonas de uso público, independientemente de que sean áreas residenciales o recreativas, son excelentes candidatas para la aplicación de lodos al suelo. Generalmente, se trata de zonas próximas a los núcleos urbanos, donde la vegetación suele ser escasa e insuficiente y la existente no está destinada al consumo humano. Los lodos han sido utilizados en los campos de golf durante años y entre los beneficios podemos destacar el incremento de fertilidad de suelo y del pH, la mejora de la retención hídrica y la estructura del suelo, el aumento de la actividad microbiana, la disminución de las poblaciones de nematodos y el reverdecimiento de la pradera. Su uso ha permitido recuperar antiguos vertederos como parques públicos, formar praderas uniformes y duraderas incluso en zonas de mucho tráfico, a bajo coste, establecer y mantener árboles y otras especies en las medianas de las carreteras y promover la vegetación a fin de disminuir las pérdidas por erosión o acidez del suelo (Palazzo e Iskandar, 1994).

Los biosólidos han sido utilizados en recuperación de suelos degradados en zonas de antiguas minas. Daniels y Haering, (1994) discutieron la utilización de materiales biosólidos, originados a partir de una mezcla de astillas y lodos compostados, estabilizados anaeróbicamente en la recuperación de una antigua zona de minas en la región de los Apalaches centrales. Después de cinco años de proyecto, los resultados indicaron que el uso de biosólidos para este fin no tenía porque comportar ningún riesgo medioambiental, siempre que éstos fueran aplicados correctamente, y tanto el suelo como la vegetación y el agua de los alrededores fuera controlada exhaustivamente después de la aplicación. Si recalcaron la necesidad de optimizar las posibles mezclas de residuos a emplear, así como las pérdidas de N. Aunque en su caso no se produjo movimiento neto de nitratos en aguas subterráneas y superficiales de los alrededores, si contemplaron pérdidas netas de N desde la superficie del suelo.

Con relación a los efectos beneficiosos inducidos por los biosólidos compostados sobre cultivos hortícolas, pueden encontrarse numerosos ejemplos en la bibliografía. Han



## I Introducción

sido ampliamente utilizados como sustitutos de la turba en la producción de plántulas, para plantación de exterior en paisajismo y como capa superior en praderas (Sanderson y Martín, 1974; Gouin y Walker, 1977; Gouin, 1985; Nelson y Craft, 1992). La respuesta del cultivo es típicamente positiva; puede ser significativamente superior a la esperada en base a los índices de mineralización encontrados (Hoitink, 1994).

La supresión de enfermedades causadas por patógenos y por microorganismos presentes en la rizosfera perjudiciales para el crecimiento explica en parte la mejora encontrada en el vigor de la planta (Hoitink y col., 1993). Entre otros efectos beneficiosos podemos citar la mejora de calidad del fruto (Vogtmann y col., 1993), el incremento en número de flores en cultivo ornamental (Logan y col., 1984) y la mejora en la supervivencia de plántulas.

La presencia de patógenos puede causar problemas en la utilización de compost en el cultivo de hortalizas, especialmente cuando el sistema de compostaje no ha podido mantener temperaturas superiores a 65° C. Esto es debido a que el elevado contenido orgánico disponible, permite a los patógenos volver a colonizar los compost que ya han sido previamente tratados (García y col., 1991), lo que causa problemas durante su utilización, como la alelopatía.

Se denominan agentes aleloquímicos aquellas sustancias que, producidas por una especie, afectan al funcionamiento de organismos de otra especie (Barceló y col., 1988). La alelopatía que representa la inhibición de un microorganismo por otro, se incrementa en hábitats ricos en nutrientes como es el caso de un compost pobremente estabilizado. Por ejemplo, el contenido de glucosa en compost fresco controla el crecimiento de la *Salmonella*, y ejerce un control biológico sobre otros patógenos de la planta (Burge y col., 1987). La influencia de la materia orgánica sobre los agentes de control biológico de la expresión genética necesita ser estudiado y los sistemas de compostaje deben ser capaces de proveer condiciones óptimas a los procesos de tratamiento para evitar los problemas de recolonización de patógenos (Hoitnik, 1994). La disponibilidad del carbono, específicamente los niveles de descomposición orgánica, predicen la composición de las

## I. Introducción

especies microbianas presentes en compost.

Las aplicaciones de los biosólidos se vienen realizando utilizando valores relativos a las turbas, y no a las necesidades reales de los cultivos. Por lo que no es de extrañar que cuando los biosólidos se utilizan en cantidades elevadas de compost, como es el caso de los semilleros, se produzcan enfermedades en plantas que pueden ser agravadas por el exceso de N. Es el caso de la acción de la *Phytophthora* y otras bacterias que producen manchas en las hojas. Los compost pueden potenciar esas enfermedades porque predomina la forma de N liberada como amonio preferida por estos microorganismos (Hoitink, 1994). Finalmente, hay que recordar que la salinidad es otro factor que debe ser considerado.

## **3. CARACTERÍSTICAS DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS**

### **3.1. Materia orgánica**

El término materia orgánica del suelo generalmente se emplea para denominar los constituyentes orgánicos del suelo, excluyendo plantas caídas y tejidos animales. Incluye por tanto sus productos parcialmente descompuestos y la biomasa del suelo (Stevenson, 1982). Este término comprende: materiales identificables de alto peso molecular, tales como proteínas y polisacáridos; sustancias simples como azúcares, aminoácidos y otras pequeñas moléculas, y por último, las sustancias húmicas.

Aiken y col. (1985) definen a las sustancias húmicas como “una categoría general de sustancias orgánicas heterogéneas, biogénicas de aparición natural tanto en medios terrestres, como acuáticos y pueden ser caracterizadas como de color amarillo-marrón a negro, de elevado peso molecular y refractarias”.

Stevenson (1994) las conceptúa como “una serie de sustancias de peso molecular relativamente elevado, de coloración amarillo a negra formadas por reacciones secundarias de síntesis y que pueden ser caracterizadas por presentar grupos funcionales ricos en

## I. Introducción

oxígeno, principalmente carbonilos, pero también grupos fenólicos y enólicos, alcohólicos y quinonas". El término es usado como nombre genérico para describir el material coloreado o las fracciones obtenidas en base a sus características de solubilidad. Estos materiales son distintos en suelos o sedimentos a los biopolímeros que constituyen microorganismos y plantas superiores, incluyendo la lignina.

Dada su complejidad química, el fraccionamiento ha sido el método más utilizado para caracterizar las sustancias húmicas. Como consecuencia han sido numerosas las fracciones aisladas a partir de las sustancias húmicas, aunque sólo tres han permanecido invariables con el transcurso del tiempo: los ácidos húmicos, los ácidos fúlvicos y la humina.

Los ácidos húmicos se conceptúan como "la fracción marrón oscura soluble en álcali diluido y otros reactivos y que es insoluble en ácido diluido, a pH menor de 2". La fracción ácido fúlvico es aquella "soluble tanto en medio ácido como básico, denominándose ácidos fúlvicos genéricos al material coloreado en la fracción ácido fúlvica". Por último, la humina es "aquella fracción insoluble en álcali".

En aguas naturales se aceptan los conceptos de TOC (Total Organic Carbon), referidos a la cantidad total de materia orgánica presente y DOC (Disolved Organic Carbón) que excluyen las formas de materia orgánica en partículas. La mayor parte de los estudios de caracterización de las sustancias húmicas acuáticas se han centrado casi exclusivamente en la fracción disuelta, que puede ser dividida en seis fracciones; fracciones hidrofóbicas ácido, básica y neutra y fracciones hidrofílica ácida, básica y neutra, siendo las sustancias húmicas el componente mayoritario de la fracción ácida hidrofóbica (Leenheer, 1981). El carbono orgánico suspendido, muy importante en las denominadas aguas negras donde la concentración de sustancias húmicas es muy elevada, está poco caracterizado por lo que sería conveniente estudiarlo en profundidad (Aiken, 1985).

Frecuentemente se utiliza el término sustancias húmicas a otros materiales orgánicos de naturaleza no específica. Es el caso de los extractos de lodos, compost y estiércoles que conforme a las definiciones operacionales de las sustancias húmicas son a menudo

asimiladas como tales, aunque no debe entenderse que son idénticas a las sustancias húmicas reales. De todas formas, también se trata de materiales compuestos de mezclas complejas de sustancias orgánicas y como consecuencia presentan las mismas dificultades de caracterización que las del suelo. Se debe considerar que con el tiempo pueden transformarse en reales, aunque algunos autores se resistan a definir las como sustancias húmicas, sólo por el hecho de que sean mezclas orgánicas complejas (Mac Carthy y col., 1990).

### **3.2 Origen de las sustancias húmicas**

Según Hayes (1992), no existe evidencia de que la síntesis de las sustancias húmicas sea controlada por factores genéticos o biológicos. La secuencia de las moléculas que se asocian para componer la estructura primaria de las macromoléculas carece de regularidad. Igualmente son invariablemente aleatorios los enlaces intra e intermoleculares que tienen lugar en las sustancias húmicas para formar las estructuras terciarias y secundarias, o la asociaciones que pueden producirse entre estas sustancias y otros materiales orgánicos e inorgánicos presente en el medio ambiente. De aquí, que no se pueda aplicar un criterio estructural como el utilizado en las proteínas.

Por el contrario, no parecen existir dudas respecto a que las sustancias húmicas se originan a partir de un número variado de precursores con numerosos procesos químicos y biológicos. La presencia en las macromoléculas húmicas de componentes atribuibles a las ligninas no implica que estas macromoléculas surjan directamente a partir de modificaciones degradativas de la lignina. Hayes (1992) asume que es igualmente probable la recombinación mediante procesos de síntesis biológica o química, bien de fragmentos de la lignina, como de compuestos moleculares liberados a partir éstas. A causa de la naturaleza heterogénea de los sustratos y de los procesos de síntesis, es posible que dos moléculas distintas se produzcan simultáneamente, por lo que es importante considerar la existencia de mezclas para una posterior caracterización de las sustancias húmicas.

Los mecanismos de formación de las sustancias húmicas de aguas superficiales no

## I. Introducción

son tan conocidos como los que originan las sustancias húmicas del suelo. Malcolm (1985) las recoge en cinco teorías.

La primera de ellas admite que las sustancias húmicas en aguas superficiales no son más que ácidos fúlvicos del suelo que han sido lixiviados o erosionados. Una segunda teoría próxima a ésta, menciona que los mismos procesos que controlan la formación de las sustancias húmicas en suelos lo hacen en medios acuosos para originar las sustancias húmicas acuáticas. La tercera teoría indicada por este autor especula con la posibilidad de lixiviación de ácidos fúlvicos del suelo en estados iniciales de humificación, para ser posteriormente modificados y transformados mediante procesos de humificación de los que resultan sustancias húmicas propias del medio acuático. Una cuarta, postula que las sustancias húmicas en aguas superficiales se forman mediante un único proceso de humificación, por condensaciones y polimerizaciones de compuestos húmicos exclusivos del medio acuático. La quinta y última teoría, sostiene que los ácidos húmicos están formados por procesos continuos de polimerización para formar unidades moleculares mayores de ácidos fúlvicos que son denominados ácidos húmicos.

### **3.3. Métodos para la extracción de las sustancias húmicas**

Dada la complejidad estructural de la materia orgánica, es importante la elección de un método de extracción que permita aislar la totalidad de las sustancias húmicas, libres de contaminantes inorgánicos y sin la alteración del material original. Además, el método debe ser aplicable a todos los suelos (Stevenson, 1994).

Whithehead y Tinsley (1964) propusieron cuatro criterios para la elección de un disolvente. El primero de ellos era que debía mostrar una elevada polaridad y constante dieléctrica que ayudara a la dispersión de las sustancias húmicas. Por otra parte, el tamaño molecular debería ser pequeño, de forma que le permitiera penetrar en las sustancias húmicas, romper los puentes de hidrógeno y proveer grupos alternativos suficientes a fin de para solvatarlos. Finalmente, sería procedente que fuera suficientemente hábil para inmovilizar los cationes metálicos.

## I. Introducción

De acuerdo con las características descritas para un método de extracción y disolvente "ideales", en la tabla 2 se resumen los métodos de extracción más utilizados.

El agua es un excelente disolvente, cuando los grupos ácidos de la macromolécula están disociados y las estructuras expandidas permiten la solvatación de las base conjugadas de los grupos ácidos. Esta disociación está mejor acompañada con el uso de una base fuerte en solución acuosa. La extracción alcalina es uno de los métodos más extendidos, especialmente con soluciones de NaOH o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 o 0,5 M y en una relación suelo extractante 1:2 o 1:5 g/mL. Entre los inconvenientes encontrados en la utilización de este extractante, el principal es la autoxidación de algunos constituyentes orgánicos producidos en contacto con el aire, que se puede solventar con la presencia de un gas inerte. Otro

**Tabla 2** Reactivos utilizados para la extracción de las sustancias húmicas constituyentes del suelo (Stevenson, 1994)

Extractante	Materia orgánica extraída (%)
Bases fuertes	
NaOH	80% aprox
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	30% aprox
Sales neutras	
$\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , NaF, orgánicas	30% aprox
sales ácidas	30% aprox
Quelatos orgánicos	
Acetilacetona	30% aprox
Cobreferrón	30% aprox
8-hydroxiquinolina	
ácido fórmico	55 % aprox
Solución de acetona $\text{H}_2\text{O}$ - HCl	20 % aprox

factor a considerar es la condensación producida entre aminoácidos y grupos carbonilo de los azúcares reductores o quinonas para formar compuestos de tipo húmico que no se encuentran originariamente.

## I. Introducción

Tanto el  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  como otras sales neutras son extractantes muy apropiados para aislar la materia orgánica floculada o que se presenta insoluble por la formación de compuestos de coordinación con iones como el  $\text{Ca}^{2+}$ . Si bien la cantidad de materia orgánica extraída es mucho menor que con la  $\text{NaOH}$ , se producen menores modificaciones químicas del material húmico extraído.

Entre las ventajas demostradas por el resto de los extractantes enunciados, destaca el ácido fórmico anhidro y los disolventes dipolares apróticos, por ser compuestos muy polares que no presenta oxidación, ni propiedades hidrolíticas, pero se solubilizan también grandes cantidades de  $\text{Ca}$ ,  $\text{Fe}$  y  $\text{Al}$  y otros compuestos inorgánicos que no están asociados a la materia orgánica. Estos se consideran como los mejores disolventes para la disolución de las sustancias húmicas (Hayes, 1985).

El método más utilizado para aislar y concentrar las sustancias húmicas acuáticas fue descrito por Aiken (1985) y se basa en la adsorción de las sustancias húmicas procedentes de una muestra de agua, previamente acidificada, a través de una columna con resina XAD-8 para ser posteriormente eluidas con una base diluida. Este método, sin embargo, presenta algunos inconvenientes que han sido comentados por el mismo autor (Aiken, 1988).

Uno de estos inconvenientes es la dependencia del fraccionamiento, tanto del volumen de solución analizada como de la concentración de materia orgánica en la muestra, estableciéndose el rango óptimo de concentraciones 2-10  $\text{mgC}\cdot\text{L}^{-1}$ . Otro de los problemas encontrados es el posible solapamiento de las fracciones, especialmente las definidas como fracciones hidrofóbicas neutras que pueden interaccionar con la resina. Esta adsorción no depende del pH y estas fracciones pueden ser recuperadas con los ácidos hidrofóbicos débiles durante la elución con base. Además, las sustancias de tipo fúlvico que presenten bajos contenidos en grupos aromáticos, no son retenidos por la resina XAD-8 y se recuperan en la fracción hidrofílica ácida. Cuando la concentración de ácidos hidrofóbicos débiles en el eluato de la resina es elevada, los ácidos pueden interaccionar y solubilizar alguna de las fracciones hidrofóbicas neutras, incorporándose al producto final. Para

terminar con las desventajas de este método hay que indicar los problemas de contaminación derivados de la resina, particularmente serios cuando la concentración de DOC en la muestra es baja.

### **3.4. Características estructurales de las sustancias húmicas**

Existen numerosos modelos estructurales para representar las sustancias húmicas, todos ellos basados en estudios sobre su composición elemental, grupos funcionales, productos de degradación, datos espectroscópicos y propiedades fisicoquímicas (Stevenson, 1994). El uso de estos modelos permite la representación media de las propiedades de los ácidos húmicos y fúlvicos; la formulación de nuevas estructuras hipotéticas e ilustrar los mecanismos de enlace de los iones metálicos.

Han sido numerosos los autores que han propuesto fórmulas estructurales para ácidos húmicos (Fuchs, Dragunovs, Flaig Steelink, Schulten y Schnitzer;) y ácidos fúlvicos (Schnitzer; Buffle) todos ellos recogidos por Stevenson (1994). Se indicarán a continuación aquellos factores que según este autor deben tenerse en cuenta a la hora de plantear un modelo.

La presencia de anillos aromáticos es importante en las estructuras de las sustancias húmicas, en especial en los ácidos húmicos, pero las cadenas alifáticas son más importantes de lo que se pensaba en estudios anteriores. Dos terceras partes de los componentes moleculares de los ácidos fúlvicos pueden ser asimilados a estas estructuras. En general, las sustancias húmicas de origen acuático presentan un mayor carácter alifático que las presentes en suelos.

Los ácidos húmicos y fúlvicos comparten algunas características comunes, pero existen significativas diferencias entre ellos. Los ácidos fúlvicos presentan un menor tamaño molecular, un contenido de O más elevado, menores contenidos de C y además, contienen más grupos funcionales ácidos, particularmente carboxílicos. Otra importante diferencia es la asociación de los oxígenos. Mientras que en los ácidos fúlvicos suelen asociarse a grupos



## **I. Introducción**

funcionales como carboxilos, cetonas o alcoholes, una elevada proporción de los oxígenos presentes en los ácidos húmicos lo hacen como componentes estructurales de núcleos, tales como enlaces éteres o ésteres.

Los ácidos grasos y las largas cadenas hidrocarbonadas son estructuras que parecen ser componentes de algunos, pero no todos, los ácidos húmicos y fúlvicos. La presencia de estos grupos puede contribuir a las características hidrofóbicas de las sustancias húmicas.

Las estructuras cíclicas condensadas, aunque presentes bajo condiciones determinadas no parecen contribuir de forma prominente a las características de los ácidos húmicos y fúlvicos.

La utilización de modelos facilita la comprensión de los mecanismos, que involucran a las sustancias húmicas, pero son estrictamente deducidos a partir de datos experimentales, y a veces no pueden ser propagadas para formular otros modelos. Estos modelos son útiles cuando corresponden a estructuras que puedan ser conocidas. Recientemente, Schulten (1996), ha propuesto un modelo tridimensional para ácidos húmicos en sistemas acuáticos y terrestres a partir de datos de espectroscopia de masas acoplada a pirólisis (Py-FIMS) y pirólisis con cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (Py-GC/MS), con la posterior optimización geométrica y molecular de los complejos húmicos con metal, usando el programa informático HyperChem para determinar, entre otros factores, las conformaciones de menor energía y los enlaces de H inter e intramoleculares.

### **3.5. Características químicas de las sustancias húmicas**

Las características químicas de las sustancias húmicas varían mucho dependiendo de factores tales como su origen, forma de extracción y posteriores operaciones de fraccionamiento y purificación. A pesar de ello, las similitudes entre las diferentes sustancias húmicas son más pronunciadas que sus diferencias. De hecho, estas semejanzas permiten su identificación en una clase. Los métodos más comunes de caracterización de las sustancias húmicas son la composición elemental y la determinación de sus grupos

## I. Introducción

funcionales.

El análisis elemental es con probabilidad, el instrumento más utilizado en la caracterización de las sustancias húmicas, aunque la mayoría de las preparaciones corresponden a mezclas de muchos componentes. Por esta razón, el análisis elemental no provee información relacionada con su fórmula molecular, sino que establece un criterio comparativo entre las diferentes sustancias húmicas de diferentes medios (Huffman y Stuber, 1985). Una manera de expresar la información sobre la composición elemental de las sustancias húmicas utiliza las relaciones atómicas entre O/C y H/C y fue aplicada a ácidos húmicos y fúlvicos por Visser (1983). Es importante indicar, que sólo se pueden comparar resultados obtenidos a partir de sustancias a las que se hayan sometido a los mismos procedimientos de extracción, fraccionamiento y purificación, ya que éstos pueden modificar los valores finales del análisis elemental (Stevenson, 1994).

Se han descrito una amplia variedad de grupos funcionales en las sustancias húmicas, incluyendo grupos carboxílicos, fenólicos, enólicos, quinonas, hidroxiquinonas, lactonas, éteres y alcohólicos, siendo empleadas en su caracterización prácticamente la totalidad de las técnicas analíticas instrumentales conocidas, aunque la mayoría de ellas se han basado en la naturaleza ácida de las sustancias húmicas (Schnitzer, 1972).

Por razón de la complejidad estructural de las sustancias húmicas, los grupos ácidos pueden solaparse, por lo que los resultados cuantitativos deben ser considerados con precaución. Existen otros problemas en la determinación cuantitativa de estos grupos, como la insolubilidad de los materiales, particularmente los ácidos húmicos en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos; los procesos de oxidación-reducción; la interacción con la mayoría de los reactivos; y la ausencia de reacciones estequiométricas. Estos problemas pueden paliarse con la utilización de métodos espectroscópicos.

Los métodos espectroscópicos en las diferentes regiones del espectro electromagnético resultan muy atractivos cuando son aplicados al estudio de las sustancias húmicas debido a que son métodos no destructivos, que requieren una pequeña cantidad de

## I. Introducción

muestra y la mayoría de ellos son sencillos en su manejo. Se diferencian los métodos de caracterización que utilizan radiación de alta energía y los que se basan en la radiación de baja energía.

En los primeros se incluyen la espectroscopia a) de absorción ultravioleta visible, b) de infrarrojo, c) Raman d) de fluorescencia, e) fotoelectrónica de rayos-X y f) Mössbauer. Todas ellas han sido detalladamente revisadas por Bloom y Leenheer (1989), Stevenson (1994) y MacCarthy y Rice (1985). Entre los métodos espectroscópicos basados en la radiación a baja energía se pueden citar la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (Wershaw, 1985; Steelink y col., 1989; Wilson, 1989; Wilson, 1990) y la resonancia de spin electrónico (Senesi y Steekink, 1989)

A continuación describiremos la composición elemental de las sustancias húmicas del suelo y sistemas acuáticos, y realizaremos un estudio comparativo de éstas con las características químicas de las sustancias húmicas provenientes de lodos.

### **3.5.1. Sustancias húmicas del suelo**

Las composición elemental media de las sustancias húmicas del suelo está indicada en la tabla (Steelink 1985). Los ácidos húmicos contienen mayor porcentaje de C, y menos

**Tabla 3** Composición elemental media de las sustancias húmicas en suelos (Steelink, 1985)

Elementos	Ácido húmico	Ácido fúlvico
	-----%	
Carbono	53,8-58,7	40,-50,6
Hidrógeno	3,2-6,2	3,8-7,0
Oxígeno	32,8-38,3	39,7-49,8
Nitrógeno	0,8-4,3	0,9-3,3
Azufre	0,1-1,5	0,1-3,6

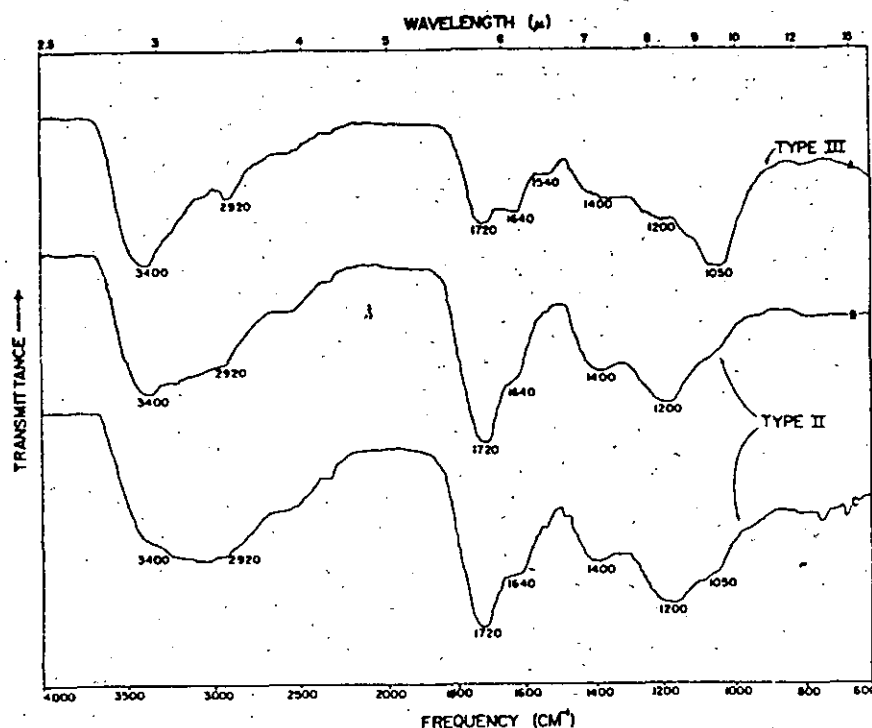
grupos funcionales con oxígeno que los ácidos fúlvicos. Dependiendo del tipo de suelo, por término medio se le asigna una acidez total a los ácidos fúlvicos de 890-1420  $\text{cmol}_c \cdot \text{Kg}^{-1}$ , bastante mayor que la correspondiente a ácidos húmicos (485-870  $\text{cmol}_c \cdot \text{Kg}^{-1}$ ), siendo los grupos fenólicos los que más contribuyen a la naturaleza ácida de estas sustancias. La concentración de los grupos funcionales ácidos en ácidos fúlvicos parece ser

## I Introducción

sustancialmente mayor que en otros polielectrolitos orgánicos presentes en la naturaleza. (Stevenson, 1985).

La relación  $E_4/E_6$ , cociente entre los valores de absorbancia a 465 nm y a 665 nm, es menor de 5 se trata de un ácido húmico de suelo, mientras que para ácidos fúlvicos se encuentra entre 6,0 y 8,5 (Schnitzer, 1981).

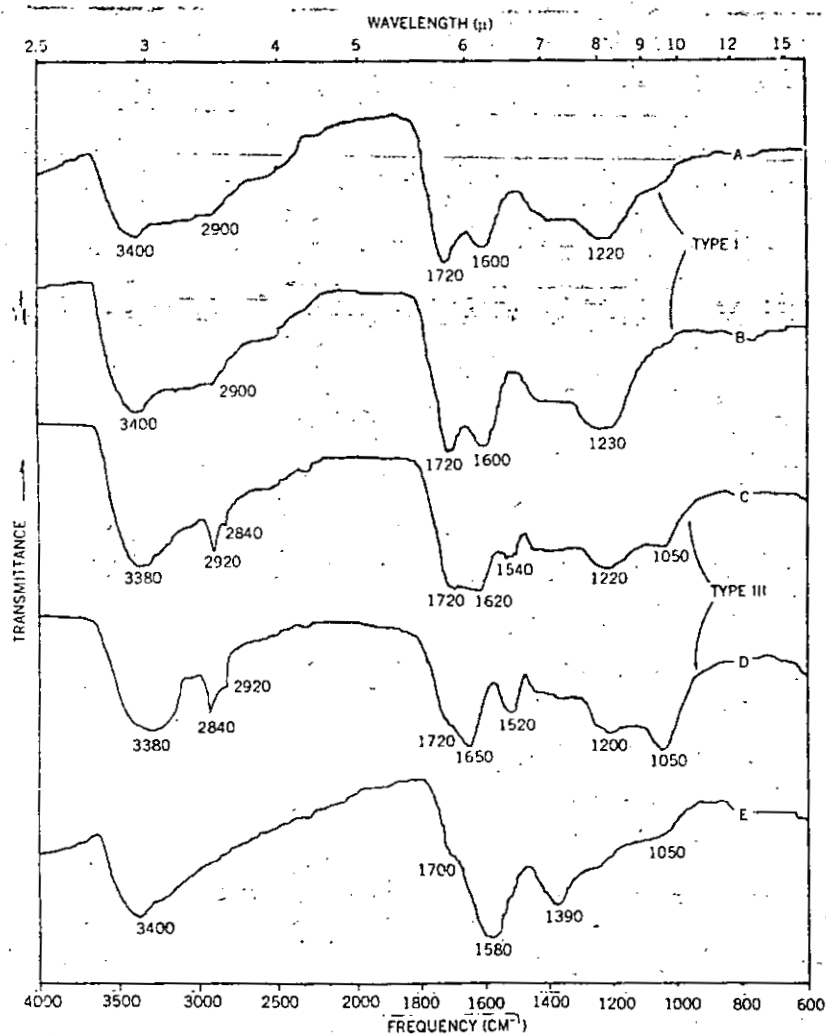
**Figura 1** Espectros infrarrojo de un ácido fúlvico constituyente del suelo de una pradera (Stevenson, 1984) A) preparación del coloide no ionizable B) componente dializable I c)



Stevenson y Goh (1971) clasificaron los espectros de IR para sustancias húmicas del suelo en tres tipos generales, mientras que Kumada (1987) realizó una segunda clasificación más elaborada. Los espectros típicos de los ácidos fúlvicos y húmicos de suelos pueden verse en las figuras 1 y 2, donde se aprecia la similitud entre ellos. La diferencia principal se encuentra en la banda a  $1720\text{ cm}^{-1}$ , considerablemente mayor en ácidos fúlvicos, debido a la concurrencia de un mayor número de grupos carboxílicos. También se aprecian diferencias en la banda a  $1600\text{ cm}^{-1}$  centrada a mayor frecuencia en los ácidos fúlvicos.

## I. Introducción

**Figura 2** Espectros Infrarrojos de ácidos húmicos para diferentes fuentes (Stevenson , 1994) A) Mollisol; B) lignita de Dakota del Norte (leonardita) C) horizonte B de un Spodosol D) Lago Mud, Florida E) sal sódica del espectro A.



### 3.5.2. Sustancias húmicas en aguas superficiales

Debido a la extensión y heterogeneidad de los sistemas acuáticos, en el apartado que ahora nos ocupan sólo se describirán las características químicas de las sustancias húmicas constituyentes de la materia orgánica en aguas continentales superficiales, en concreto lagos, sin considerar otros ecosistemas, como acuíferos, marismas o estuarios.

## I. Introducción

El análisis elemental medio obtenido para ácidos húmicos y fúlvicos de sedimentos de lago se exhiben en la tabla 4. Estos valores están dentro de los rangos atribuidos a suelos.

**Tabla 4** Valores medios de la composición elemental de las sustancias húmicas originarias de sedimentos de lago (Ishiwatari, 1985)

Elementos	Ácido húmico	Ácido fúlvico
	-----%-----	
Carbono	52,05 ± 3,61	44,98 ± 3,90
Hidrógeno	5,67 ± 0,65	5,12 ± 1,24
Oxígeno	36,55 ± 4,27	42,27 ± 4,69
Nitrógeno	5,63 ± 1,08	7,63 ± 0,56

Ishiwatari (1985) describió los valores para  $E_4/E_6$ , se encuentran entre 5,1-6,3 para los ácidos húmicos y 24-26,8 para los ácidos fúlvicos. Los espectros de UV-visible de las sustancias húmicas asociadas a los sedimentos de lago indican la existencia de trazas de clorofila y otros pigmentos como carotenos, que no pueden eliminarse ni con la

extracción de disolvente orgánicos, ni con filtración sobre gel (Povoledo y col., 1975)

Los espectros de IR de los ácidos húmicos procedentes de muestras de diferentes lagos, son bastante similares, indicando una similitud de las características químicas estructurales que están relacionadas con sus absorciones en el IR, especialmente en la presencia de grupos funcionales que contienen oxígeno y en el carácter aromático. Los estudios de hidrólisis de las características en el IR de los ácidos húmicos muestran una banda de absorción a  $1540\text{ cm}^{-1}$ , probablemente debida a los enlaces peptídicos. De acuerdo con los datos recogidos parece existir evidencia de presencia de estructuras aromáticas (Ishiwatari, 1967).

Los ácidos fúlvicos, por el contrario, no presentan un comportamiento tan homogéneo en la región del Infrarrojo como el descrito para los ácidos húmicos, probablemente como consecuencia de la dificultad para aislar los materiales inorgánicos y a la existencia de otros materiales orgánicos en la fracción (Ishiwatari, 1985). Sin embargo, los ácidos fúlvicos muestran esencialmente las mismas bandas de absorción que caracterizan los ácidos húmicos, a excepción de la banda del grupo carboxilo que aparece a  $1740\text{ cm}^{-1}$  para los ácidos fúlvicos y a  $1720\text{ cm}^{-1}$  para los húmicos.

## I. Introducción

### **3.5.3. Características químicas de los ácidos fúlvicos y húmicos procedentes de lodos y enmendantes de suelos**

Las fracciones húmicas y fúlvicas obtenidas a partir de lodos muestran algunas características químicas y estructurales diferentes, en comparación con las sustancias húmicas derivadas del suelo. Entre ellas se incluyen mayores contenidos de N y S, así como mayor presencia de los componentes alifáticos que en las sustancias húmicas del suelo. Por el contrario, las sustancias húmicas procedentes de lodos disminuyen la acidez total y se presentan con frecuencia asociadas a proteínas y materiales alifáticos que son claramente definidos por los espectros de infrarrojo.

#### *A) Ácidos fúlvicos*

Las fracciones fúlvicas obtenidas a partir de lodos originados en plantas de tratamiento como puede verse en la tabla 5, muestran las siguientes diferencias respecto el contenido elemental de los ácidos fúlvicos de suelo: contenidos de S que pueden alcanzar valores 20 o 40 veces superiores a los valores medios presentados en suelos; una relación H/C mayor que indica mayor proporción de componentes alifáticos, y una relación C/N menor que ha sido atribuida a un contenido superior de productos procedentes de la descomposición de proteínas (Boyd y Sommers, 1990).

**Tabla 5** Valores medios para la composición elemental de las sustancias húmicas procedentes de lodos (Boyd y Sommers, 1990)

Elementos	Acido húmico	Acido fúlvico
	-----%-----	
Carbono	52,20	40,8
Hidrógeno	7,2	6,6
Oxígeno	36,52	42,3
Nitrógeno	8,78	2,8
Azufre		8,2

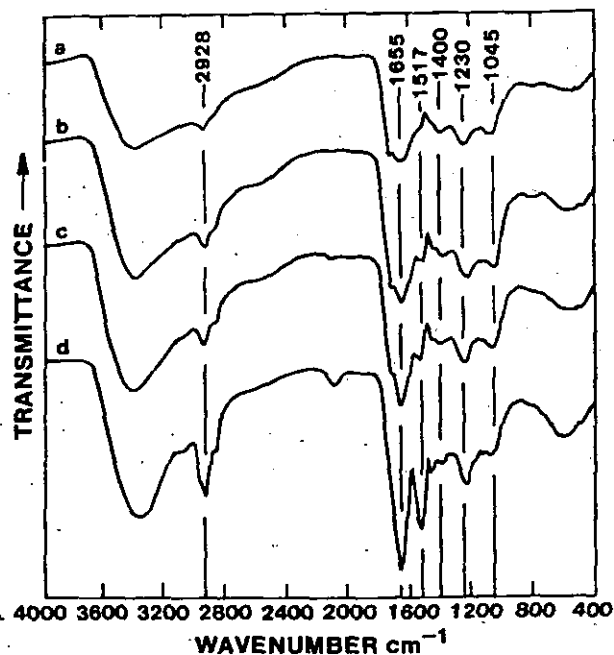
Según Schaumberg y col., (1982) la principal característica que distingue la fracción fúlvica de un lodo es su elevado contenido en S encontrado mayoritariamente como éster sulfato orgánico (69%).

## I. Introducción

De acuerdo con datos aportados por Riffaldi (1982), la acidez de los grupos carboxílicos para los ácidos fúlvicos presentes en lodos es significativamente más baja que para los ácidos fúlvicos del suelo. Los espectros Ultravioleta visible son cualitativamente similares. La relación  $E_4/E_6$  es inferior a la de los ácidos fúlvicos del suelo, pero próxima a los límites superiores encontrados en los ácidos húmicos del suelo, con valores próximos a 6. La interpretación convencional, basada en que las menores relaciones  $E_4/E_6$  presentan estructuras más condensadas, no es aplicable en este caso porque la relación H/C indica que los ácidos fúlvicos de suelo son más condensados que los presentes en lodos (Boyd y Sommers, 1990).

La figura 3 muestra el espectro de IR para la fracción fúlvica de tres lodos estabilizados anaeróbicamente, A, B1 y C (Sposito y col., 1976) comparado con el espectro de IR de un ácido fúlvico extraído de una turba de Rifle D (Stevenson y Goh, 1971).

**Figura 3** Espectro de IR de las fracciones fúlvicas de tres lodos estabilizados anaeróbicamente (a, b1 y c) y de suelo (d). (Boyd y Sommers, 1990).



En el apartado correspondiente a caracterización de sustancias fúlvicas del suelo (3.5.1) se han descrito las bandas de absorción más importantes en el espectro de infrarrojo:



## *L. Introducción*

absorción a  $2940\text{ cm}^{-1}$  producida por el alargamiento del enlace C-H de los grupos alifáticos; bandas debidas a los grupos C=O del carboxilo y de las amidas  $1740$  y  $1650\text{ cm}^{-1}$ ; y por último el alargamiento del enlace C-O de los polisacáridos a  $1540\text{ cm}^{-1}$ .

Las principales bandas que diferencian a las fracciones fúlvicas procedentes de lodos de las extraídas de suelo son las bandas a  $1360$ ,  $1160$ ,  $880$  y  $580\text{ cm}^{-1}$ . Las bandas a  $1360$ ,  $1160$  y  $580$  fueron asignadas a los grupos sulfónicos (Sposito y Holtzclaw, 1982).

### *B) Ácidos húmicos*

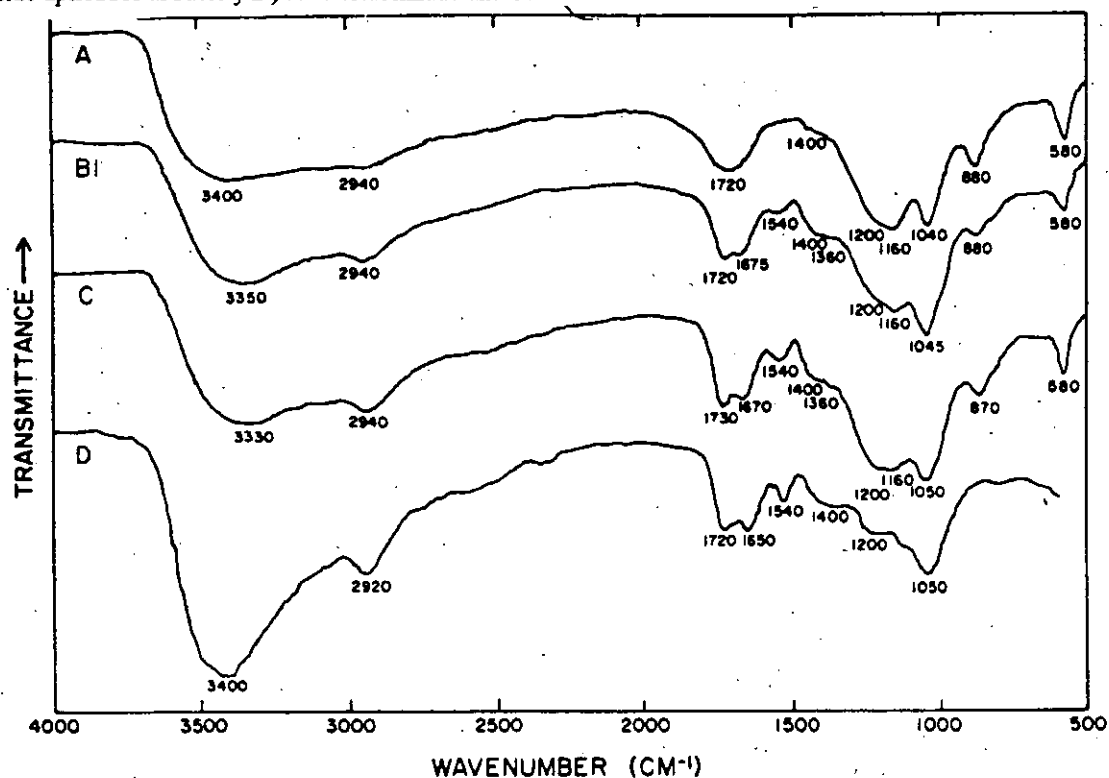
Boyd y col., (1980) y Rifaldi (1982), caracterizando ácidos húmicos extraídos de distintos lodos, encontraron que el 17% del C orgánico presente en el lodos correspondía a la fracción húmica, y que estaba distribuida de forma equivalente entre los ácidos húmicos y fúlvicos.

Comparativamente, respecto a las características químicas de los ácidos húmicos del suelo, los ácidos húmicos procedentes de lodos presentan aproximadamente el doble del contenido de N y como resultado se disminuye la relación C/N en un 50%. El elevado contenido de N del lodo, posiblemente sea debido a la asociación de productos descomposición de las proteínas (Boyd y Sommers, 1990). La relación H/C disminuye con relación a los ácidos húmicos del suelo, lo que sugiere estructuras menos condensadas. La fracción húmica de los lodos contiene muchos menos grupos carboxílicos, manifiesta una menor acidez total y una relación  $E_4/E_6$  menor que la indicada para ácidos húmicos del suelo.

La figura 4 muestra el espectro de IR obtenido para un ácido húmico extraído de un lodo estabilizado anaeróbicamente (d), después 2 y 14 meses de haber sido añadido a un suelo agrícola (b) y (c) respectivamente, comparado con un ácido húmico extraído de un suelo (a). El espectro del ácido húmico procedente del lodo muestra dos bandas intensas a  $1650$  y  $1520\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las bandas I y II amidas originadas a partir de materiales proteicos; y otras dos bandas intensas a  $2850$  y  $2950\text{ cm}^{-1}$  debidas al

alargamiento de los grupos CH. Este espectro de IR sugiere que la fracción ácido húmico obtenida de un lodo tiene asociado un alto contenido de proteínas y materiales alifáticos, como grasas y ceras (Boyd y Sommers, 1990; Riffaldi, 1982; González-Villa y Martín, 1985), resultados que han sido confirmados por  $^{13}\text{C}$ -NMR (González-Villa y Martín, 1985).

**Figura 4** Espectro IR de ácidos húmicos extraídos de: A) suelo, B) y C) de lodos, 14 y 2 meses después de haber sido aplicados al suelo y D) lodo estabilizado anaeróbicamente.



## **4. INTERACCIONES DE LA MATERIA ORGÁNICA CON LOS IONES METÁLICOS.**

### **4.1 Importancia de la quelación**

Cabría afirmar que cualquier aspecto de la química de los elementos metálicos en suelos está relacionada con la formación de complejos estables con las moléculas orgánicas. Aunque la mayor parte de los elementos metálicos en suelos se presentan precipitados o retenidos por las arcillas y coloides húmicos, la solubilización de cationes presenta gran importancia, pues la formación de complejos metal-materia orgánica puede tener diferentes

## **I. Introducción**

efectos. Debido a la importancia del tema existen numerosas revisiones que estudian las reacciones de los metales traza con la materia orgánica (Bloom, 1981; Chen y Stevenson, 1986; Sposito y Page, 1984; Stevenson, 1986; Stevenson, 1991; Stevenson y Ardakani, 1972; Stevenson y Fitch, 1986).

La principal consecuencia de estas reacciones es la actuación de las sustancias orgánicas como transportadores de elementos traza en la solución del suelo incrementando su disponibilidad en este medio. También, pueden aumentar la solubilidad de componentes del suelo que en un principio son insolubles, como es el caso de la solubilización de fosfatos minerales procedentes de fosfatos insolubles a través de la complejación de Fe y Al en suelos ácidos y del Ca en suelos calizos.

Los agentes acomplejantes naturales son de suma importancia en el transporte de elementos a otros ecosistemas, tales como lagos y ríos. Existen estudios sobre la deposición ácida implica a las sustancias orgánicas en la solubilización del Al desde el suelo hasta las aguas naturales.

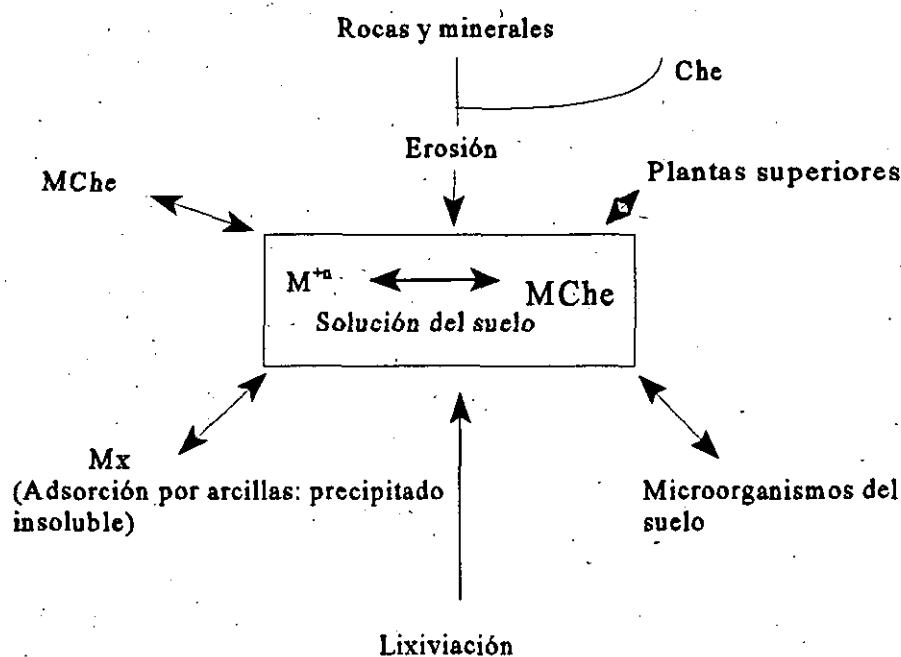
La figura 5 describe de forma esquematizada estas reacciones. Los elementos metálicos presentes en la solución del suelo se encuentran como complejos orgánicos solubles ( $MCh_e$ ), y especies inorgánicas cargadas. Se ven directamente influidos por la acción de los microorganismos y plantas superiores.

Centrándonos en la influencia de la formación de complejos sobre la nutrición de la planta y atendiendo al tipo de enlace, los metales pueden clasificarse en tres grupos (Stevenson, 1994). En primer lugar aquellos que son esenciales para las plantas pero que no están enlazados a los compuestos de coordinación, incluyen cationes monovalentes como el  $K^+$ , y divalentes como el  $Ca^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$ . A continuación un segundo grupo que presenta los metales esenciales para las plantas y que forman enlaces coordinados con ligandos orgánicos. Incluyen todos los metales de la primera serie de transición, tales como el  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ; y de la segunda serie de transición como el Mo. Por último, aquellos que no presentan una función bioquímica concreta en animales y plantas, pero que son

## I. Introducción

acumulados en el medio ambiente. En este grupo se encuentran el  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ , que son introducidos en el suelo como contaminantes.

**Figura 5** Reacciones de la materia orgánica que involucran iones metálicos en suelos (Stevenson, 1994)



La mayoría de estos iones metálicos pueden aceptar más de un par de electrones y coordinarse simultáneamente con el correspondiente número de átomos donadores. Cuando dos o más posiciones de un ion metálico se coordinan por dos o más grupos donadores de un único ligando para originar una estructura de anillo se forma un complejo quelato. La palabra quelato deriva del griego chele, que hace referencia a las pinzas del cangrejo y a la forma en la cual es enlazado el metal.

La formación de quelatos metálicos con la materia orgánica puede tener diferentes efectos en suelo y algunos de ellos inciden directamente sobre la planta como es el caso de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular y otros compuesto bioquímicos que forman complejos solubles con los micronutrientes. Estos compuestos pueden actuar como transportadores dando lugar al incremento de la disponibilidad de los micronutrientes a las plantas superiores.

### **4.2. Agentes quelantes de la materia orgánica**

De acuerdo con Wolt (1994), el carbono orgánico total en la disolución del suelo se describe típicamente en base a la extracción acuosa como DOC, carbono orgánico disuelto. Comprenden dos tipos de compuestos orgánicos. El primero implica a compuestos bioquímicos definidos, de bajo peso molecular y sintetizados por organismos vivientes, tales como ácidos alifáticos simples, aminoácidos, sideróforos hidroxámicos, fitosiderofóros, fenoles y ácidos fenólicos y fenoles poliméricos. En segundo lugar existen una serie de polielectrolitos ácidos coloreados de amarillo a negro formados por reacciones de síntesis secundaria y referidos como ácidos húmicos y fúlvicos. Son compuestos de alto peso molecular que se suspenden coloidalmente en la solución del suelo.

Tanto los denominados compuestos bioquímicos, como los ácidos húmicos y fúlvicos forman complejos con elementos traza y otros cationes polivalentes presentes en suelos. En general, forman complejos solubles en agua, mientras que los complejos formados con sustancias húmicas, particularmente los ácidos húmicos, son en su mayoría insolubles.

#### **4.2.1. Compuestos bioquímicos**

Los compuestos bioquímicos solubles en agua presentan habilidad para quelar iones metálicos cuando son producidos por la actividad microbiana o excretados por las raíces. Se encuentran tanto en la rizosfera, como en los lixiviados formados a partir de los residuos de descomposición de residuos vegetales (Stevenson, 1991; Stevenson y Ardakani, 1972; Stevenson y Fich, 1986).

En la mayoría de los suelos de cultivo, el enlace metal materia orgánica estará producido por un número relativamente elevado de ligandos presentes en pequeñas cantidades más que por unas pocas especies mayoritarias presentes en altas concentraciones. Así, mientras la concentración de cualquier compuesto bioquímico o clase de éstos puede ser baja, el efecto de acumulación de todas las especies acomplejadas puede

## I. Introducción

ser apreciable. En muchos suelos, la combinación total de quelatos que se forman en solución acuosa es probablemente suficiente para considerar las cantidades de iones metálicos presentes, normalmente en un rango de  $10^{-9}$ - $10^{-6}$ M (Stevenson, 1994).

Stevenson (1994) describe los factores que afectan a la producción de compuestos bioquímicos e incluye la humedad del suelo, el tipo de planta y estado de crecimiento, así como la práctica de cultivo y clima, principalmente temperatura y pluviosidad. Se pueden esperar cantidades elevadas a principio de la primavera cuando se inicia la descomposición de los residuos procedentes de las plantas, decrece en los meses calurosos de verano, dado que se reduce la actividad microbiana y se vuelve a incrementar otra vez con las lluvias tempranas cuando el crecimiento de la planta cesa. Los suelos enmendados con estiércoles y otros residuos orgánicos presentan una riqueza elevada en compuestos bioquímicos.

Los compuestos orgánicos tienen una gran capacidad para enlazar el  $\text{Fe}^{3+}$  debido a su alto contenido en oxígeno (por ejemplo, grupos carboxílicos y fenólicos, enólicos y alcohólicos). Las sustancias que contienen N (aminoácidos, porfirinas) tienen una alta afinidad por el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Ni}^{2+}$  y también contribuyen a la quelación del  $\text{Fe}^{3+}$ .

Entre los principales compuestos bioquímicos encontramos:

### *a) Ácidos orgánicos de bajo peso molecular*

Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular son importantes constituyentes solubles de las aguas naturales, aunque están poco caracterizados y frecuentemente se encuentran asociados a los compuestos de alto peso molecular que constituyen la materia orgánica, pero se distinguen de ellos en función de su distribución y aparición (Wotli, 1994).

Hay pocos estudios de la composición de la solución del suelo que detallen suficientemente la distribución del carbono orgánico, a fin de determinar las contribuciones de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular al total del DOC en la solución del suelo.

## I. Introducción

De todos los componentes del DOC presentes en la solución del suelo, los ácidos orgánicos se consideran los de mayor movilidad y están muy relacionados con la actividad biológica en la rizosfera. Cualquier mecanismo de adsorción del suelo puede estar más o menos controlado por los ácidos orgánicos de bajo peso molecular, especialmente aquellos que presenten una elevada reactividad química (McKeague y col., 1986; Qualls y Haines, 1992).

Su concentración en la solución del suelo se estima entre  $1 \cdot 10^{-3}$  a  $4 \cdot 10^{-3} M$ , pero se producen cantidades mayores en la rizosfera y en la capa orgánica del suelo (Stevenson, 1994). Son importantes agentes que afectan a la complejación, disponibilidad y transporte de los metales en suelos y consecuentemente influyen en la degradación mineral de éstos. Algunos estudios de laboratorio apuntan a la existencia de complejación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular con metales y por tanto un efecto de disolución de los minerales del suelo, por ejemplo la formación de complejos organometálicos de aluminio (Hue y col., 1986; Michalas y col., 1992), pero según Wolt (1994) estos estudios se han realizado bajo concentraciones y condiciones improbables en la disolución del suelo.

El ácido oxálico es un importante agente quelante de  $Fe^{3+}$  y también de  $Al^{3+}$  y  $Ca^{2+}$  en suelo de bosques.

### *b) Sideróforos hidroxámicos y fitosideróforos*

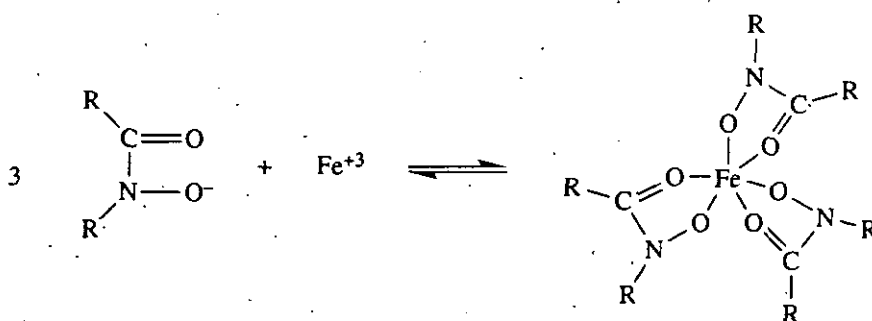
Se cree que la disponibilidad del Fe en suelos calizos depende en gran medida de los agentes quelantes orgánicos, que pueden ser excretados por las raíces de las plantas, fitosideróforos o producidos en la rizosfera por microorganismos, sideróforos hidroxámicos.

Actualmente se poseen evidencias que indican que los sideróforos juegan un papel importante en la nutrición férrica de plantas cultivadas en suelos calizos. Estas sustancias contienen grupos reactivos  $-CO-NOH-$  y presentan constantes de estabilidad excepcionalmente elevadas (aprox  $10^{32}$ ) (Stevenson y Fitch, 1986) debidas parcialmente a

## I Introducción

la estructura del quelato de Fe con el hidroxamato que se muestra en la figura 6. Powel y col. (1980, 1982) encontraron concentraciones de fitosideróforos en un rango de 0,1 a 0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  en la solución del suelo (humedad de campo) y concentraciones superiores en un 10-50% en la rizosfera.

**Figura 6** Formación de un fitosideróforo de  $\text{Fe}^{3+}$



### *c) Fenoles y ácidos fenólicos*

Los constituyentes fenólicos son abundantes en los restos en descomposición de plantas y animales y en los exudados de las raíces. La concentración de ácidos fenólicos en la solución de suelos agrícolas se estima entre  $5\cdot 10^{-5}$  a  $3\cdot 10^{-4}$  M y presentan mayor solubilidad que los ácidos orgánicos alifáticos (Stevenson, 1994).

Tanto los fenoles como los ácidos fenólicos se consideran relevantes en la complejación y traslocación de Fe y Al en suelos de bosque. Típicos ejemplos de ácidos fenólicos incluyen los ácidos gálico, cafeico y protocatequinas

### *d) Polifenoles*

Los polifenoles se refieren a sustancias que contienen más de un anillo aromático y el grupo OH fenólico. Son productos de degradación de residuos vegetales y de la descomposición oxidativa de ácidos fúlvicos y húmicos. Destacan los flavonoides y taninos.



## **I. Introducción**

Los taninos representan un grupo poco definido de sustancias con pesos moleculares entre 500 a 3000 Daltons y que contienen por lo menos uno o dos grupos fenólicos OH por cada 100 daltons. Existen dos tipos: hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables presentan un ácido gálico y/o ácido hexahidroxifenico enlazado a un azúcar a través de un enlace glicosídico. Tienen numerosos grupos fenólicos para enlazar al  $\text{Fe}^{3+}$  y otros cationes polivalentes.

### **4.2.2. Ácidos fúlvicos**

Los ácidos fúlvicos son la principal consecuencia de la disolución del material húmico en suelos y sus principales características ya han sido descritas en el apartado 3.5.1 de esta Introducción. En comparación con los ácidos húmicos los ácidos fúlvicos presentan menores pesos moleculares, contienen cantidades relativamente similares de carbono e hidrógeno, pero mayores proporciones de oxígeno y nitrógeno; y son más reactivos dado su tamaño y sus mayores concentraciones de acidez total y carboxílica, características que les confiere una mayor movilidad y capacidad para transportar metales.

Estos compuestos se consideran agente complejantes de metales más importantes que los compuestos bioquímicos, como consecuencia de la gran estabilidad de los complejos que forman, a excepción de los sideróforos.

### **4.3. Efectos del carbono orgánico disuelto y en estado coloidal sobre la biodisponibilidad y transporte de los iones metálicos.**

Los coloides son partículas de baja solubilidad que permanecen como fase sólida identificable en disolución. Aunque existen ácidos fúlvicos de bajo peso molecular considerados demasiado pequeños para ser coloidales, la mayor parte de las sustancias húmicas se engloban en la categoría de macromoléculas y como tales pueden presentarse en estado coloidal (Stevenson, 1994).

Tanto la movilidad como la biodisponibilidad de los compuestos químicos en suelos

y aguas pueden verse modificadas por los fenómenos de solubilización de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular, o bien por los procesos de adsorción de la materia orgánica coloidal suspendida.

### **4.3.1. Solubilización de sólidos**

Muchos autores han descrito la importancia de los materiales orgánicos sobre la biodisponibilidad y transporte de los compuestos químicos (Bloom, 1981; Chen y Stevenson, 1986; Sposito y Page, 1984; Stevenson, 1986; Stevenson, 1991; Stevenson y Ardakani, 1972; Stevenson y Fitch, 1986). La influencia de la materia orgánica sobre la reactividad del suelo esta asociada a numerosos procesos directos e indirectos que se producen en los materiales sólidos del suelo y en la fase acuosa. Su consecuencia inmediata está relacionada con la degradación de los materiales orgánicos y la incorporación al suelo de la materia orgánica en fase coloidal. En este momento el carbono orgánico se presenta en grandes cantidades y con elevada reactividad actuando como sumidero para los compuestos químicos.

Wolt (1994) destaca la relevancia de los ligandos orgánicos que son introducidos en la solución del suelo desde fuentes externas concentradas en carbono orgánico. Estos ligandos actúan sobre el suelo incrementando la biodisponibilidad y transporte de nutrientes y compuestos fitotóxicos. La disolución del suelo puede verse afectada por la presencia de la materia orgánica disuelta y en estado coloidal, de forma que se modifique su fuerza iónica y al balance de cargas, así como a las concentraciones totales de compuestos químicos existentes en la solución del suelo y el grado en que estos compuestos están disponibles en el medio ambiente. La incidencia de los ligandos orgánicos sobre la biodisponibilidad y transporte se modificará claramente en función del gradiente de C a través de la solución del suelo. Existen fenómenos localizados que pueden producir altas concentraciones pasajeras de carbono orgánico en la solución del suelo, tales como la incorporación de estiércoles, residuos de animales, o lodos que pueden producir flujos de carbono orgánico a través de la solución del suelo durante cortos periodos de tiempo.

## I. Introducción

Parecen ser significativos los efectos del carbono orgánico sobre la disolución de los minerales, cuando la concentración del carbono orgánico se considera razonable, por lo menos en condiciones localizadas y a corto plazo. Pohlman y McCall (1986) mostraron una liberación rápida de Mg en suelo de bosque cuando la lixiviación se producía por el efecto de ácidos orgánicos presentes en suelo de 0,5 a 5,0 mmol·L<sup>-1</sup>, la relación de Mg desplazado por los ácidos orgánicos era mayor que la presencia de los ácidos minerales. De esta forma, bajo condiciones de flujos rápidos de carbono orgánico en medioambientes localizados, el desgaste mineral puede ser más rápido que en condiciones “normales”.

En esta premisa se basa la utilización de estiércoles, residuos de animales, o lodos para contrarrestar las causas de la infertilidad en suelos ácidos. Las elevadas cantidades de material orgánico incorporado al suelo pueden actuar como neutralizador de la acidez del suelo, aumentando la relación del Ca<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup>, o alterando la disponibilidad de nutrientes traza o elementos fitotóxicos (Wolt, 1994).

### **4.3.2. Adsorción**

La mayoría de las partículas suspendidas en sistemas acuosos naturales están negativamente cargadas debido a la adsorción de materia orgánica (Davis y Gloor 1981; Knight y col., 1992; Liang y col., 1993; McCarthy y col., 1993). Esta adsorción puede enmascarar las propiedades fisicoquímicas del sólido cuyo comportamiento, movilidad electroforética, estabilidad coloidal y transporte, tenderán a ser dominados por la materia orgánica adsorbida.

Gu y col (1994) han propuesto que los principales mecanismos por los cuales la materia orgánica se adsorbe en la superficie del mineral son a) intercambio aniónico (interacción electrostática) b) intercambio ligando superficie de complejación c) interacción hidrofóbica d) efecto entrópico e) puentes de hidrógeno y f) enlace catiónico (Sposito, 1984). Sin embargo, en la bibliografía están recogidas pocas medidas directas para evaluar estos mecanismos.

## I. Introducción

El intercambio del ligando por el OH o el  $\text{H}_2\text{O}^+$  de la superficie es el mecanismo más extendido para los óxidos de hierro y la materia orgánica disuelta (Murphy y col., 1990; Tipping, 1981; Davis, 1982). Parfitt y col (1977) han demostrado por espectroscopia de infrarrojo que la adsorción del ácido fúlvico sobre la goethita se produce entre los grupos  $\text{COO}^-$  del ácido fúlvico y los grupos OH de la goethita. Estos autores también han subrayado que la adsorción de estos ácidos orgánicos está normalmente acompañada por un incremento del pH, lo que indica que los grupos  $\text{COO}^-$  del ácido fúlvico reemplazan a los OH de los óxidos. Sin embargo, Inoue y Wada (1968) indicaron que las sustancias húmicas son adsorbidas sobre la alofana a través de un mecanismo de intercambio aniónico. Jardine y col (1989) estudiaron la adsorción de la materia orgánica sobre diferentes suelos que contenían entre 1-3% de Fe extraíble en Ditronito-citrato-bicarbonato (DCB) y concluyeron que el mecanismo predominante de adsorción en suelos era la adsorción física dirigida por los cambios de entropía favorables. Estas aparentes discrepancias entre autores pueden ser en parte explicadas por los diferentes materiales y las condiciones experimentales usados, que se justificarían por la heterogeneidad y complejidad de la materia orgánica y las superficies adsorbentes. Las características fisicoquímicas y estructurales de la materia orgánica y minerales en suelo puede dar lugar a diferentes mecanismos de adsorción.

Los procesos de desorción han sido estudiados en menor extensión que la adsorción, a pesar de que éstos influyen cuantitativamente en el transporte de la materia orgánica. La presencia de relaciones de adsorción-desorción ha recibido poca atención, y la cinética que controla estas relaciones todavía es desconocida. Algunas formulaciones matemáticas del transporte, consideran que el proceso adsorción/desorción es reversible (van Genuchten y col., 1974.). Pero existen otros estudios (Amacher y col., 1986) que han demostrado que la adsorción/desorción con diferentes iones metálicos no puede ser descrita por el uso de un equilibrio reversible de los modelos Freundlich o Langmuir.

Gu y col (1994) observaron los procesos de adsorción y desorción de la goethita sobre una muestra de materia orgánica de origen acuoso. Concluyeron que el mecanismo es debido a un intercambio de ligandos, por lo menos cuando el pH está por debajo del

## **I. Introducción**

correspondiente al punto isoelectrico del óxido.

El mecanismo de adsorción del óxido de hierro por la materia orgánica está controlado por el pH (Murphy y col., 1990, 1992; Tipping, 1981; Davis, 1982). Dicho mecanismo, consistiría en un intercambio aniónico, al menos, mientras el óxido de hierro empieza a estar positivamente cargado, mientras la materia orgánica se carga negativamente cuando el pH decrece. Sin embargo, estos mecanismos no son los únicos que controlan la adsorción. El efecto de otros aniones específicamente adsorbidos tales como el fosfato y el sulfato, pueden reducir la adsorción. El efecto del fosfato es mayor que el sulfato.

Los efectos de adsorción y desorción de los óxidos de Fe con la materia orgánica deben ser considerados en la utilización de biosólidos como fertilizantes férricos. Las adiciones de Fe, Mn o Al durante el tratamiento del lodo o fabricación del biosólido para incrementar la capacidad de absorción específica del metal pueden limitar la disponibilidad de estos metales (Chaney, 1994). La materia orgánica puede estabilizar al óxido de hierro, produciendo dos efectos; a) la creación de un pool de Fe debido a la estabilización del óxido menos cristalino que puede ser disuelto por los ácidos orgánicos y microorganismos, actuando como un fertilizante de liberación lenta, o bien, b) este depósito está fuertemente enlazado y el Fe no está suficientemente lábil para ser transportado a la planta.

## **5. EFECTOS DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS SOBRE LA PLANTA**

Chen y Aviad (1990) enumeraron los mecanismos mediante los cuales, la materia orgánica puede afectar indirectamente a la fertilidad del suelo

1. Aporte de minerales, principalmente N, P, K y micronutrientes a las raíces;
2. Beneficia a la estructura del suelo, debido a la mejora en la relación agua-aire de la rizosfera
3. Un incremento en el suelo de la población microbiana incluyendo microorganismos beneficiosos

## **I. Introducción**

4. Aumento tanto en la capacidad de intercambio catiónico, como de la capacidad tampón del suelo
5. Aporte de compuestos bioquímicos definidos a las raíces de la planta tales como acetamida y ácidos nucleicos
6. Aporte de sustancias que pueden actuar como transportadores de micronutrientes o estimuladores del crecimiento

Estos mismos autores subrayaron la importancia de los denominados efectos directos que son aquellos que requieren absorción de macromoléculas orgánicas, del tipo de las sustancias húmicas, por el tejido vegetal, lo que produce diferentes efectos bioquímicos en la pared celular, membrana celular o en el citoplasma.

Debido a la complejidad del sistema suelo, normalmente es difícil estudiar el efecto de las sustancias húmicas sobre el crecimiento de la planta. Por ello se suelen simplificar estos estudios, realizando el seguimiento de plantas cultivadas en solución nutritiva, aplicando directamente o vía foliar las sustancias húmicas que previamente han sido extraídas.

### **5.1 Respuesta de las plantas a las sustancias húmicas**

#### **5.1.1 Germinación y crecimiento de plántulas**

Los efectos de las sustancias húmicas sobre la germinación y el desarrollo de plántulas han sido estudiados por numerosos investigadores, enumerando a continuación algunos de los ensayos más relevantes. En general se acepta la existencia de una fuerte respuesta a las sustancias húmicas sobre el desarrollo de la planta que afecta también al rendimiento final. El efecto beneficioso observado en el caso concreto de la germinación se atribuye a la mejora de la actividad enzimática en el tejido de la semilla.

Ya en 1962, Smidova estudió los efectos del humato de Na sobre la imbibición de agua y la germinación del trigo (*Triticum aestivum* L.). El incremento de la absorción de

## I. Introducción

agua, respiración y germinación fue observada en soluciones de  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  humato de Na. Dixit y Kishore (1967) se centraron en la estimulación de la germinación en diferentes variedades de cultivos por ácidos húmicos (HA) y fúlvicos (FA). La germinación del maíz (*Zea mays* L.) fue incitada por  $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AH o FA; mientras que la de cebada (*Hordeum vulgare* L.) y trigo por  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  HA y  $45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  FA, respectivamente.

Lulakis y Petsas (1995) estudiaron la eficacia de sustancias húmicas extraídas a partir de compost de sarmientos, sobre el desarrollo de plántulas tomate. Las sustancias húmicas beneficiaron, tanto el desarrollo del tallo como el de la raíz en concentraciones intermedias (100-300 ppm), pero ambos se inhibían a concentraciones elevadas (1000-2000 ppm). El efecto beneficioso de las sustancias húmicas fue mayor para el desarrollo del tallo, siendo el rango de concentraciones óptimo el del FA y el de menor el del HA.

### **5.1.2. Iniciación y crecimiento radicular**

Las sustancias húmicas parecen tener un efecto mayor sobre las raíces que sobre otras partes de las plantas (Sladky, 1959). La estimulación del crecimiento de la raíz y de la iniciación radicular han sido efectos comúnmente observados y pocas veces explicados. Khristeva (1949) estudió la respuesta de diferentes plantas al Na-humato de diferentes orígenes sobre trigo cultivadas en hidroponía. Tanto la longitud de la raíz, como la del tallo se incrementaron, y en los casos óptimos casi el doble. La concentración óptima de humato sódico era  $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , pero a  $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  el crecimiento de las plantas era comparable al de los controles cultivados en agua. Las raíces secundarias no se desarrollaron en los controles, pero sí se observó un desarrollo importante en las soluciones donde se añadió humato. Kononova y Pankova (1950) encontraron respuestas similares en el desarrollo radicular de plantas de maíz. En este mismo cultivo pero sobre agar, Ivanova (1965) también comprobó el efecto inhibitorio del crecimiento cuando las dosis aplicadas superaban  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de HA.

Fernández (1968) condujo una serie de ensayos sobre raíces de maíz para probar los efectos de las sustancias húmicas originadas de la descomposición de materia orgánica de

## I. Introducción

un mejor aspecto. Las plantas que mostraron mayor número de raíces laterales fueron las cultivadas en una dosis de  $5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de leonardita -precisamente, la mayor de las concentraciones utilizadas en el ensayo-. El efecto de las sustancias húmicas coincidía con los resultados alcanzados para el ácido indol 3-butírico. Se debe resaltar que las plantas fueron cultivadas en agua y no en solución nutritiva.

Goenadi y Sudharama (1995) comprobaron la acción de un ácido húmico natural sobre el desarrollo del tallo en plantas de *Gnetum gnemon*, *Elletaria cardamomum*, y *Pogostemon cablin*. El periodo de iniciación del tallo fue significativamente menor en presencia del ácido húmico. La iniciación de la raíz fue significativamente inducida especialmente cuando los ácidos húmicos fueron usados en medio líquido.

Chen y Aviad (1990) resumen la actividad de las sustancias húmicas según se describe a continuación. Independientemente del origen de las sustancias húmicas su aplicación produce un aumento del desarrollo radicular tanto en disolución nutritiva como en aplicación foliar, afectando tanto a la elongación como a la formación de raíces secundarias. Los resultados sobre experimentos vegetales indican que los ácidos fúlvicos tienen un efecto ligeramente mayor que los ácidos húmicos. Por último, hay que señalar que la concentración del ácido húmico es importante, y generalmente la respuesta decrece en concentraciones elevadas.

### **5.1.3 Desarrollo del tallo**

Los estudios de la influencia de las sustancias húmicas sobre el desarrollo de la parte aérea se han efectuado tradicionalmente sobre plantas jóvenes cultivadas en tiesto o en solución nutritiva, aunque en los últimos años han aumentado el número de trabajos en campo. En la mayoría de los casos se observa que el efecto de las sustancias húmicas es más importante en el crecimiento radicular que en el de la parte aérea.

Los ácidos fúlvicos y húmicos pueden estimular el crecimiento del tallo dependiendo del tipo de planta cuando son aplicados foliarmente en concentraciones de 50 a  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$



## 1. Introducción

dos fuentes: estiércol humificado de un año, y residuos vegetales obtenidos después varios años de compostaje. Los ácidos húmicos procedentes de estiércol incrementaron el desarrollo radicular, mientras que los ácidos húmicos originados de restos vegetales lo inhibían. La dependencia de los efectos en función del origen de los ácidos húmicos es algo inusual en la bibliografía pero podría estar relacionada con el grado de humificación y las diferencias en la estructura química de las sustancias húmicas probadas (Chen y Aviad, 1990).

El efecto de la concentración de las sustancias húmicas sobre el crecimiento radicular y la proliferación de raíces secundarias ha sido comprobada por muchos autores. En plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivadas en hidroponía el crecimiento se producía hasta dosis de  $160 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de HA (Sánchez-Conde y Ortega, 1972). Tan y Nopamornbodi (1979) extrajeron un ácido húmico de un suelo arcilloso y estudiaron su influencia sobre el crecimiento radicular de plántulas de maíz después de 5 días en solución Hoagland con y sin ácido húmico. A concentraciones de  $640 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  HA y  $1600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  HA, las raíces eran significativamente más largas mientras que las concentraciones superiores de  $3200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  HA eran menos efectivas.

Una respuesta típica del desarrollo radicular frente a la concentración de ácido fúlvico fue descrito por Rauthan y Schnitzer (1981) en un estudio sobre pepino (*Cucumis sativus* L.). Las adiciones de ácidos fúlvicos fueron beneficiosas hasta  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AF, siendo el incremento de peso y longitud significativo en el intervalo de concentraciones de 100 a  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AF.

En contraste otros autores, Fortún y López-Fando (1982), no observaron incremento de peso seco en raíces de maíz cuando el ácido húmico se adicionaba de 100, 250 y  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

O'Donnell (1973) estudió el efecto de diferentes sustancias húmicas todas originadas a partir de la leonardita, y las comparó con el ácido indol-3-butírico. Además de una mejora en el desarrollo y proliferación radicular, comprobó que las raíces presentaban

(Chen y Aviad, 1990) o si son aplicados en solución nutritiva en concentraciones de 25 a 300 mg·L<sup>-1</sup>. El efecto estimulante sobre el tallo normalmente se correlaciona con la respuesta radicular al modo de aplicación.

### **5.2. Mecanismos involucrados con la estimulación del crecimiento en planta**

#### **5.2.1. Absorción de macronutrientes**

El crecimiento de la planta ha sido atribuido comúnmente a la mejora en la absorción de nutrientes debido a las sustancias húmicas (Chen y Aviad, 1990), por lo que se han realizado numerosos trabajos para confirmar esta teoría, aunque en la actualidad no se encuentra resuelto.

Son numerosos los efectos encontrados sobre los macronutrientes. Gaur (1964) observó un incremento en la absorción de N, P y K, así como detrimento en la concentración de Ca en césped (*Lolium perenne* L.) cultivado en tiestos sobre suelo enmendado con un ácido húmico extraído de compost. Sánchez-Conde y Ortega (1968) encontraron un incremento en la absorción de N, P y Mg y detrimento en Ca, K y Na cuando se aplicaban dosis de 8, 80 y 100 mg·L<sup>-1</sup> de HA sobre plantas de pimienta. Estos autores encontraron niveles tóxicos de N, P y Mg acumulados en raíces.

David y col (1994) estudiaron los efectos de un ácido húmico sobre la acumulación de nutrientes y el desarrollo de plántulas de tomate en solución con disponibilidad limitada de nutrientes. La adición de 1280 mg·L<sup>-1</sup> de HA produjo un incremento significativo en la acumulación de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, y Zn en tallo, así como en la concentración de N, Ca, Fe, Zn, y Cu en raíz. El peso fresco y seco de raíz también se incrementó. Sin embargo, comparando la acumulación de nutrientes en plantas tratadas con 1280 mg·L<sup>-1</sup> AH y aquellas en las que se había realizado un aporte adicional de nutrientes equivalente a la existente en el tratamiento con ácidos húmicos, las primeras acumularon más N, P, K, Fe y Cu en tallo y las raíces más K y Ca. Según los autores, estos incrementos no parecen estar asociados con los nutrientes contenidos en los ácidos húmicos. Un aumento del pH de la

## I. Introducción

solución de 5.8 a 7 no produjo efecto sobre la acumulación de nutrientes o crecimiento de las plántulas de tomate. La interacción del pH y la adición del ácido húmico no fue significativa.

Fagbenro y Agboola (1993) estudiaron el efecto de un ácido húmico sobre el crecimiento y absorción de nutrientes de la teca (*Tectona grandis* L.). Las plantas se cultivaron durante cuatro meses en dos suelos de cultivo, un Alfisol (alto contenido en materia orgánica) y un Oxisol (bajo contenido en materia orgánica) en el sur de Nigeria. Se ensayaron tres niveles de ácidos húmicos 50, 500, y 1000 mg·kg<sup>-1</sup> aplicados a los dos suelos. Los resultados indican que el ácido húmico benefició el crecimiento y la absorción de nutrientes de las plántulas de teca. Tanto la altura de las plántulas como el peso seco se incrementó en los dos suelos y en los tres niveles de aplicación. Las dosis superiores a 500 mg·kg<sup>-1</sup> adicionadas al Alfisol fueron menos beneficiosas mientras que los parámetros de crecimiento y la absorción de nutrientes tendía a incrementarse proporcionalmente a las cantidades de ácido húmico aplicado en el Oxisol. La adición de los ácidos húmicos a los dos suelos incrementó la absorción por las plántulas de N, P, K, Mg, Ca, Zn, Fe, y Cu, mientras el Mn decrecía.

Irintoto y col., (1993) estudiaron el efecto de las sustancias húmicas sobre el crecimiento y la absorción de nutrientes del *Pinus elliottii* Engelm, en cultivo *in vitro*. Los resultados mostraron el efecto de las sustancias húmicas sobre el tamaño del callo y el incremento sobre los contenidos de P, K, Ca y S. El efecto fue atribuido a la reacción de las sustancias húmicas para incrementar la permeabilidad de las membranas del callo. El aumento observado en el de peso del callo era consecuencia del incremento de la absorción y de la mayor acumulación de nutrientes.

Piccolo y col (1992) seleccionaron diferentes extractos húmicos con distintas características físicas y químicas, obtenidos a partir de la extracción de diferentes suelos y de diferentes fuentes, con el fin de estudiar su actividad biológica. Las características estructurales de las sustancias húmicas fueron asociadas a la absorción de nitrato por plántulas de cebada y la regulación del crecimiento en lechuga y berros. Los resultados

## I. Introducción

mostraron que la fracción húmica más efectiva en la absorción de nitrato y en la actividad hormonal presentaba el mayor número de grupos ácidos y el menor tamaño molecular, mientras el contenido en grupos alifáticos y aromáticos de los extractos parecía no jugar un papel importante. Las fracciones de bajo peso molecular mostraron resultados que confirmaban la eficacia de la combinación alta acidez y bajo peso molecular para influir en la actividad biológica del sistema de plantas estudiado.

Kreij y Bazar (1995) estudiaron el efecto de las sustancias húmicas sobre la absorción de nutrientes en orégano, laurel y albahaca cultivadas en un sistema similar al NFT (nutrient film technique) pero en dos sustratos diferentes turba y perlita, tres niveles de sustancias húmicas y a dos pHs, 4,5 y 6,5. Las sustancias húmicas no afectaron a la absorción de K, Ca, and Mg en parte aérea, pero disminuyeron la de Fe, Mn, Zn, y Cu en los tres cultivos estudiados. El efecto fue más pronunciado en la perlita que en la turba, y mayor a pH 4,5 que a 6,5. Según estos autores, la causa de la disminución de los micronutrientes fue la complejación de los metales por las sustancias húmicas y la consecuente pérdida de disponibilidad de las formas acomplejadas, aunque esperaban mayor complejación a pH 6,5 que a 4,5. Esta suposición no parece del todo apropiada, ya que iones como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  compiten más por los lugares de complejación a pH 6,5 que a 4,5, por lo que la complejación a pH 4,5 sería mayor, apoyando de esta manera los resultados experimentales citados. Otro de los resultados que encontraron fue la disminución del peso fresco del tallo cuando las plantas eran cultivadas a pH bajo. De acuerdo con los autores podría ser consecuencia de la toxicidad de las sustancias húmicas a bajos pH, ya que a pH elevados este efecto se aminoraba.

Ayuso y col (1996), compararon los efectos de las sustancias húmicas extraídas de residuos municipales y de leonardita, turba y ácidos húmicos comerciales sobre el crecimiento de la planta y la absorción de nutrientes por plantas cultivadas en hidroponía. Con relación a las dosis, cuando se presentaban los valores menores ( $10 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se favorecía el crecimiento de la planta, más en parte aérea que en raíz, mientras que valores superiores podían inhibirlo. Las diferentes sustancias húmicas afectaban de forma similar a la absorción de macronutrientes; favoreciéndose la asimilación de N, K y P.

## I. Introducción

El hecho de que las sustancias húmicas puedan afectar a la absorción de algunos elementos por facilitar su liberación desde el componente mineral del suelo no debe ser desestimado. Pero según Chen y Aviad (1990), aunque estos efectos pueden ser importantes en suelos, no contribuyen a la respuesta de plantas cultivadas en solución nutritiva.

### **5.2.2. Absorción de micronutrientes**

Ya hemos indicado la importancia de las reacciones de complejación entre las sustancias húmicas y los metales de transición tales como Cu, Zn, Fe y Mn. La solubilización de micronutrientes desde sus formas inorgánicas por las sustancias húmicas se considera como el principal factor de influencia sobre el desarrollo de plantas cultivadas en suelo. La presencia de las sustancias húmicas puede contribuir a mejorar la disponibilidad de los elementos.

Debido a las importantes pérdidas económicas generadas por la clorosis férrica, el hierro ha sido el microelemento que más atención ha recibido por parte de los investigadores. Ya en 1955, Dekkock concluyó que sustancias húmicas derivadas de la lignina mantenían el Fe en solución, tanto en solución nutritiva como en los tejidos de la planta, incluso en presencia de altas concentraciones de fosfato. Las sustancias húmicas no sólo incrementaban la solubilidad de Fe en solución sino que también afectaban a la traslocación de Fe de la raíz al tallo. Linehan y Shepherd (1979) compararon los efectos de un ácido fúlvico con los del ácido polimaleico y otros policarboxilatos. La adición del ácido fúlvico en concentraciones superiores a  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  mejoraba la absorción de Fe al tallo de plántulas de trigo. El ácido polimaleico y los otros policarboxilatos mostraron un resultado similar.

Chen y colaboradores (Barak y Chen, 1982; Chen y col., 1982a b; Chen y Barak 1983; Bar-Ness y Chen, 1990a, b) han demostrado que materiales orgánicos enriquecidos con hierro, como turbas o estiércoles, podrían servir como remedio a la clorosis inducida por suelos calizos. El efecto correctivo es atribuido a la complejación del hierro por las

## I. Introducción

sustancias húmicas en los materiales orgánicos.

Álvarez-Fernández y col (1996) estudiaron el efecto de diferentes quelatos comerciales y una mezcla de un ácido húmico con EDTA sobre la absorción del Fe en *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Rambo cultivado en tiestos con suelo calizo (11%  $\text{CaCO}_3$ ). La mezcla produjo un incremento en el contenido de Fe y Mn en tallo, mientras que en raíz se observó incremento de K y Zn.

El efecto de las sustancias húmicas sobre la absorción de Cu y Zn también ha sido estudiado, tanto en tejido vegetal, como en planta.

La materia orgánica puede reducir la absorción de la planta de algunos metales que pueden ser adsorbidos desde la solución. White y Chaney (1980) siguieron la absorción de Zn, Cd y Mn en dos suelos enmendados con Zn y Cd. Los suelos contenían 1,2% y 3,8% de materia orgánica. Los efectos tóxicos de las plantas se redujeron por los altos contenidos en materia orgánica que enlazaba los elementos metálicos produciendo su insolubilización.

Aparentemente, la solubilidad de las fracciones añadidas de materia orgánica es un factor importante que determina si se produce la estimulación o la inhibición. Otros factores importantes son la concurrencia de mecanismos específicos de absorción de micronutrientes desde los complejos a la superficie de las raíces, como es el caso conocido del Fe (Marschner y col., 1986). Claramente, bajas concentraciones de complejos solubles de sustancias húmicas con Fe, Zn, Cu o Mn potenciarán su absorción por la planta, mejorando el nivel nutricional (Rauthan y Schnitzer, 1981; Ayuso y col 1996).

García-Mina y col (1995) realizaron el estudio comparativo del efecto de diferentes complejos húmico-ferrosos con otros compuestos orgánicos e inorgánicos de Fe(II) sobre la absorción de Fe del trigo. Solamente el complejo fulvato-Fe(II) produjo un incremento significativo de este micronutriente.

### **5.2.3. Absorción de las sustancias húmicas y efectos bioquímicos**

#### **5.2.3.1. Absorción de sustancias húmicas**

La afirmación de que las sustancias húmicas tienen un efecto directo sobre el crecimiento de la planta implicaría que estos materiales podrían ser tomados por ellas. Para comprobar esta aseveración, han sido realizados algunos estudios a los que a continuación se hacen referencia.

Vaughan y McDonald (1976) analizaron la absorción de  $^{14}\text{C}$  procedente de una sustancia húmica por componentes subcelulares de raíces de remolacha. La mayor radioactividad estuvo asociada a las células de la pared celular y se encontraron cantidades menores en los ribosomas y mitocondrias. En un estudio posterior sobre raíces de guisante (*Pisum sativum* L.), Vaughan y Ord (1981) mostraron que la relación de absorción de los ácidos fúlvicos y húmicos se incrementaba con el tiempo de incubación, preferentemente en las sustancias de bajo peso molecular. Los autores sugirieron que las moléculas de bajo peso molecular eran tomadas activa y pasivamente por la planta y podían considerarse biológicamente activas, mientras que las moléculas de pesos moleculares superiores a 50.000 Dalton eran tomadas pasivamente. Por el contrario, Vaughan y col., (1985) concluyeron que la mayor parte de las fracciones de bajo peso molecular de las sustancias húmicas eran tomadas activamente por las plantas, función que debe ser clarificada.

Parece probable que los ácidos fúlvicos presentan mayor actividad biológica que los ácidos húmicos. Este hecho se ha corroborado por los estudios mencionados anteriormente y no debe desestimarse esta potencial actividad biológica de los ácidos fúlvicos.

#### **5.2.3.2. Efectos bioquímicos**

##### **a) Efectos sobre las membranas**

La estimulación de la absorción iónica por los tratamientos con materiales húmicos

## *I. Introducción*

ha llevado a proponer que estos materiales afectan a la permeabilidad de la membrana (Vaughan y McDonald, 1971; 1976).

El modo de acción de las sustancias húmicas sobre las membranas no ha sido definido con precisión, pero es probable que esté relacionado con la reactividad en la superficie de estos compuestos (Chen y Schnitzer, 1978), resultado de la presencia de sitios hidrofóbicos e hidrofílicos. De esta forma, las sustancias húmicas pueden interaccionar con los fosfolípidos de las membranas celulares y reaccionar como transportadores de nutrientes a través de ellos.

### *b) Energía de metabolismo*

Existen autores que indican que las sustancias húmicas son capaces de potenciar la fotosíntesis y la respiración. Se ha comprobado en plantas de tomate cultivadas en solución nutritiva y condiciones axénicas, en las que se adicionaron ácidos fúlvicos y húmicos (Vaughan, 1967). En estas condiciones se observó que las concentraciones de clorofila se incrementaban.

### *c) Actividad enzimática*

La hipótesis de que las sustancias húmicas pueden actuar como reguladores hormonales lleva a muchos autores a estudiar su influencia sobre la actividad enzimática, especialmente los efectos sobre el metabolismo del ácido 3-indol-acético (IAA). Mato y col (1971, 1972a, b) presentaron una serie de trabajos en los que se estudiaba la inhibición del IAA por ácidos húmicos, fúlvicos o fracciones de sustancias húmicas. Estos autores encontraron que los ácidos húmicos no fraccionados eran más efectivos para suprimir el IAA que cualquiera de las fracciones. Obviamente, mantener elevada la actividad de la planta afecta positivamente al crecimiento de ésta.

Las sustancias húmicas han demostrado afectar además las actividades de otras enzimas como la fosfatasa, invertasas, colin esterasa y peroxidasa.



## I. Introducción

Nardi y col (1991) describieron la acción biológica directa de las sustancias húmicas por la disociación de la estructura sustancia húmica-ácido fúlvico. Para investigar esta interacción y los efectos de ácidos fúlvicos y sustancias húmicas sobre la absorción del nitrato se estudió la actividad de la  $Mg^{2+}K^{+}$  ATPasa microsomal en raíces de avena. Observaron que los ácidos fúlvicos estimulaban la absorción de nitrato activando la ATPasa de los microsomas radiculares en la avena. Se producía, además, extrusión de  $H^{+}$  por las raíces y disminución de la concentración de la ATPasa, pero no se observaba influencia sobre el consumo de  $O_2$ . En contraste, todo el constituyente húmico inhibía el transporte de  $NO_3^{-}$ , no observándose otros efectos importantes sobre las variables consideradas. Concluyeron sugiriendo que los ácidos fúlvicos estimulaban el transporte de  $NO_3^{-}$  por activación del  $K^{+}$  que estimula la ATPasa cuyas actividades disminuyen el contenido de ATP de la célula. Estos efectos son probablemente debidos a las características surfactantes de las sustancias húmicas (concentración crítica micelar era  $0,25 \text{ mgC}\cdot\text{ml}^{-1}$  para ácido fúlvico y  $0,36 \text{ mgC}\cdot\text{ml}^{-1}$  para constituyentes húmicos) así como a su actividad biológica.

Maggioni y col (1992) también estudiaron el efecto de las sustancias húmicas de bajo peso molecular ( $< 5 \text{ kDa}$ ) sobre las ATPasas del plasmalema y el tonoplasto, utilizando vesículas de membranas aisladas de raíces de avena. Las moléculas húmicas en concentraciones superiores a  $0,50 \mu\text{C}\cdot\text{ml}^{-1}$  estimulaban la actividad de la ATPasa en ambas membranas. Los resultados demostraron que las propiedades de transporte de la membrana plasmática y el tonoplasto que regulan el metabolismo celular y la nutrición mineral puede ser modulado por diferentes modos de acción y por sustancias húmicas de bajo peso molecular.

La actividad de la arylsulfatasa de suelos y los complejos húmico-arilsulfato extraídos del suelo fue evaluada por Whalen y Warman (1996), usando como sustratos el sulfato de p-nitrofenil y compuestos de bajo peso molecular (500-10000) del tipo éster sulfato. El tamaño molecular, concentración y composición química de los compuestos de bajo peso molecular éster sulfato afectaron a la hidrólisis de sustratos de bajo peso molecular.

## 1. Introducción

Muscolo y col. (1996) estudiaron el crecimiento en células de zanahoria cultivadas con suplementos hormonales y dos fracciones de ácidos húmicos extraídos de excrementos de lombrices, una muy ácida y con pequeño tamaño molecular aparente y la otra poco ácida y con elevado tamaño molecular. Los autores encontraron que la fracción fuertemente ácida estimulaba la actividad de la glutamato deshidrogenasa y de la fosfoenol piruvato carboxilasa, sin que la presencia de las dos hormonas afectara la acción de esta fracción. Las propiedades reguladoras de la fracción fuertemente ácida parece depender de la combinación de elevada acidez especialmente C carboxílicos con bajo peso molecular.

Pinton y col. (1995) atribuyeron el papel de las sustancias húmicas en el crecimiento de la planta a los efectos de las actividades redox de superficie, en base a datos experimentales obtenidos tras estudiar el efecto de fracciones húmicas de bajo (< 5 kDa, LMW) y alto peso molecular (> 5 kDa, HMW) sobre las actividades redox de las raíces de avena. Estos resultados confirman la presencia de múltiples tipos de actividades de oxidoreductasa en la superficie de raíz de avena y muestran que las dos fracciones húmicas de alto y bajo peso molecular pueden afectar de forma diferente a estas actividades, inhibiendo parcial o totalmente la actividad de la oxidasa NADH. Puede ser una posible vía de interferencia que involucre a las sustancias húmicas en la formación de la pared celular.

No se puede descartar el posible papel regulador de las sustancias húmicas, principalmente de las fracciones con bajo peso molecular aparente y elevada densidad de grupos ácidos. Como ya hemos indicado, estas fracciones son fisiológicamente muy activas y pueden estar involucradas en muchos procesos biológicos. Por lo tanto, no debería despreciarse la posibilidad de que estos productos comercializados como fertilizantes actúen más como bioestimulantes.

## **II. OBJETIVO**

## II Objetivo

Aunque, el uso de quelatos sintéticos de hierro sigue siendo el método más eficaz para el tratamiento de la clorosis férrica, presenta importantes inconvenientes. Cabe destacar entre ellos su elevado coste, así como su difícil degradación con sus implicaciones medio ambientales, lo cual ha dado lugar a la búsqueda de otros métodos alternativos, como es el caso de la utilización de quelatos naturales. El desarrollo de humatos y fulvatos férricos como agentes quelantes ha estado condicionado por la escasa eficacia demostrada cuando son aplicados en suelos, a consecuencia de la baja estabilidad de los compuestos formados (Lucena, 1990).

Esta circunstancia no es obstáculo para que se les reconozcan efectos positivos sobre el crecimiento, que se estiman relacionados con su actividad como bioestimuladores o como reguladores hormonales.

Anualmente, se generan numerosos subproductos industriales con características apropiadas para ser utilizados en agricultura entre los que destacan aquellos que presentan en su composición elevadas cantidades de sulfatos de hierro y materia orgánica. Uno de los procesos en los que se generan esta clase de materiales es la potabilización de aguas de consumo, durante la cual la materia orgánica es coagulada con sulfato de hierro de elevada pureza. La presencia de sustancias húmicas, fundamentalmente ácidos fúlvicos dado su origen acuoso, y su alto contenido en hierro, parece conferir a este producto cualidades suficientes para solventar las deficiencias de hierro en cultivos sensibles a este micronutriente.

Si bien, estos efectos han sido corroborados en condiciones de cultivo controlado, pocos han sido los ensayos de campo que demuestren la absorción de hierro por la planta a partir de estos subproductos.

Tampoco han sido suficientemente caracterizadas las interacciones de este metal con la materia orgánica en estos compuestos, cuando aquellas resultan especialmente relevantes para entender su comportamiento en suelo. Al respecto, no se debe olvidar que estos fertilizantes originados a partir de suproducos industriales, presentan en su contenido otros elementos que pueden influir tanto, positiva como negativamente en el posterior desarrollo

## II Objetivo

de la planta, lo que justifica que también deben ser evaluados.

Los productos que se estudiarán en esta memoria proceden de las estaciones depuradoras de aguas de consumo de la ciudad de Tampa (Florida, USA). Son aguas que en origen presentan altos niveles de materia orgánica, coagulada con sales de Fe tal como ya se ha indicado. Debido a los numerosos controles a los que son sometidos los embalses de los que proceden, los restos sólidos desechados de la potabilización no deberían presentar elevados niveles de contaminantes.

En base a estas consideraciones se planteó como objetivo principal *“comprobar la eficacia bien como abono férreo, o como bioestimulador de biosólidos obtenidos en la potabilización de aguas de consumo de la ciudad de Tampa, estos productos son comercializados con los nombres de Aquamato férreo y Doliron”*. Para la consecución de este objetivo se desarrolló el siguiente esquema de trabajo.

1. Caracterización de los dos productos utilizados de acuerdo con los métodos oficiales de Análisis, con el fin de conocer la composición del material objeto de estudio.

2. Para evaluar su utilización como fertilizantes, se procedió a determinar la solubilización y disponibilidad de macro y micronutrientes, frente a los diferentes materiales del suelo y suelos agrícolas.

3. A fin de valorar su capacidad para actuar como quelato de hierro, se caracterizó el extracto húmico total del Aquamato férreo, y sus asociaciones con Fe.

4. Sosteniéndose mayoritariamente en la bibliografía que la fracción de menor peso molecular y mayor contenido en grupos funcionales ácidos es la fracción fisiológicamente más activa, se analizaron las características ácido-base de una mezcla de ácidos fúlvicos proveniente del Aquamato férreo.

## **II Objetivo**

---

5. Con el propósito de evaluar en experiencias de campo la efectividad de estos productos sobre la nutrición de macro y micronutrientes, y en especial a fin de valorar su carácter de alternativa a los quelatos sintéticos, se estudió el efecto de su aplicación a diferentes cultivos.

### **III. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS**

## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1. Origen de los productos

Como ya se ha señalado en la introducción, en las últimas décadas han aparecido en el mercado de fertilizantes productos y enmiendas orgánicas fabricados a partir de subproductos de actividades agropecuarias, municipales o industriales que pretenden ser introducidos en el medio agrícola, entre otras funciones, como correctores de las deficiencias de micronutrientes. Estos productos, con características químicas similares a las sustancias húmicas del suelo, se presentan como alternativa a los tradicionales quelatos sintéticos, defendiendo su uso con fundamento en su menor coste e impacto medioambiental.

Los dos productos objeto de nuestro estudio tienen un origen común, aunque en el mercado se presenten de forma diferente. Si bien no pueden ser considerados residuos, ya que no son desechos de alguna actividad humana, sí son obtenidos como consecuencia de actividades antrópicas.

El humato de hierro procede de las plantas potabilizadoras de agua de las ciudades de Tampa, Orlando y Miami (Florida, EE.UU.) y obtenido por coagulación del residuo orgánico sólido con sulfato ferroso de elevada pureza. En el mercado se puede presentar de diferentes formas. Se denomina *Aquamato férrico*, al humato de hierro sólido simplemente sometido a un proceso de secado y tamizado, que presenta un aspecto de polvo marrón oscuro, de modo que todas sus partículas pasan el tamiz de 2 mm. Este producto fue suministrado por Ferinsa (Fertilizantes e Insecticidas, S.A. Valencia).

Cuando el humato de hierro se modifica mediante un tratamiento con dolomita, se conoce comercialmente como *Doliron* y fue proporcionado por Vigiron Inc. (Bartow, Florida, EE.UU.). Su aspecto es el de un sólido granulado, de color ocre.

Tanto el Doliron como el Aquamato férrico son estables a temperatura ambiente,



### III Caracterización de los productos

sus propiedades no se ven afectadas por la luz y no presentan toxicidad alguna.

Debido a su origen, se caracterizan por un alto contenido en Fe y materia orgánica, lo que les hace aptos para ser utilizados como correctores de la clorosis férrica en suelos con un elevado nivel de caliza. De su composición nos vamos a ocupar de forma detallada seguidamente.

#### **1.2. Análisis de los productos**

Ya hemos indicado que el fin de estos humatos férricos es ser utilizados como correctores de la clorosis férrica, para lo cual es necesario conocer aquellas de sus características químicas que inciden en la nutrición mineral de la planta. Con dicha finalidad se realizó el análisis del Doliron y del Aquamato férrico de acuerdo con los Métodos Oficiales de Análisis de productos orgánicos fertilizantes publicados por la Dirección General de Política Alimentaria del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (M.A.P.A, 1994). Se indica de forma expresa en aquellos supuestos en los que se ha optado por la aplicación de otros métodos de análisis.

Con carácter previo las muestras se secaron en estufa a 30° C y se trituraron manualmente. De la muestra fina se tomaron las distintas alícuotas para el análisis de:

- Humedad por pérdida de peso a 105 °C (pp 52).
- Materia orgánica total por calcinación directa a 540° C (pp 53-54).
- Materia orgánica total por oxidación con dicromato potásico en medio sulfúrico y posterior valoración por retroceso con sal de Möhr (sulfato ferroso-amónico) (pp 54-56).
- Extracto húmico total y ácidos húmicos tras someter las muestras a una extracción alcalina y precipitación en este extracto de los ácidos húmicos a pH=1 (pp 56-60).
- pH del extracto 1/25 (pp 60-62).
- Conductividad del extracto en agua (1/25) (pp 239-240).
- Contenido de macronutrientes y micronutrientes extraíbles según el método ABA-DTPA (Soltanpour y Schawb, 1977) y posterior determinación de los mismos por

### III Caracterización de los productos

espectrofotometría de Absorción Atómica.

-Análisis elemental CHN medido con un aparato Perkin Elmer modelo 240 CHN Elemental Analyzer

- Contenido de macro y micronutrientes totales previa digestión de las cenizas con  $\text{HNO}_3\text{:HCl}$  (1:3) y medida directa por espectrofotometría de Absorción Atómica.

Para determinar el contenido de macro y micronutrientes se pesaron 0,100 g de las cenizas y se disolvieron en un vaso de precipitados de 150 ml totales con 10 ml de mezcla  $\text{HNO}_3\text{:HCl}$  (1:3) preparada con reactivo para análisis. Seguidamente se sometieron a ebullición casi hasta sequedad, sin permitir que la evaporación fuese completa. Se redisolvió el residuo en 20 ml de  $\text{HCl}$  2M y se filtró con papel Whatman (de filtrado rápido nº 2) sobre un matraz de 100 ml, lavando completamente el papel y el residuo con agua destilada. A continuación se midieron directamente en la disolución macro y micronutrientes por espectrofotometría de Absorción Atómica, en las condiciones descritas en el capítulo VI, punto 1.5.3.1. "Determinaciones por Absorción Atómica."

#### **1.3 Solubilidad en agua en diferentes condiciones de Ca-pH**

El ion bicarbonato se produce como consecuencia de la disolución del dióxido de carbono y es uno de los principales factores que inducen la clorosis férrica en suelos calizos. Numerosos autores han estudiado el efecto de este ion sobre la absorción de Fe por la planta (Loeppert y col, 1988; Romera y col, 1992; Susin y col, 1996). Parece ser que el ion  $\text{HCO}_3^-$  en la solución del suelo presenta una importante efecto tampón, principalmente en presencia de  $\text{CaCO}_3$ . Dado que el ion bicarbonato es una especie bastante móvil y por el contrario la difusión del  $\text{CO}_2$  es un proceso lento, la reducción de pH consecuencia de la liberación de protones por la planta es pequeña en suelos calizos (Lucena, 1998). Simultáneamente a la formación del  $\text{HCO}_3^-$  se liberan iones  $\text{Ca}^{2+}$ , que pueden desplazar al Fe de los agentes quelantes utilizados como correctores.

El objetivo de este ensayo es estudiar la influencia de la concentración  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{CaCO}_3$  sobre la solubilidad del Aquamato férrico y Doliron cuando son aplicados a suelos calizos. Se trató de obtener un valor relativo de esta solubilidad después de hacerlos reaccionar con

### III Caracterización de los productos

distintos iones, en diferentes proporciones y con diferentes tiempos de interacción.

El reactivo elegido para determinar la solubilidad fue  $\text{CaCl}_2$  (Panreac). Las concentraciones ensayadas fueron dos,  $10^{-2}\text{M}$  y  $10^{-1}\text{M}$ , disueltas en  $\text{NH}_4\text{Ac}$  1M y a pH 7,0. En 5 ml de este reactivo se suspendieron de forma independiente 1,00 gr de Aquamato férrico y 1,00 gr de Doliron, agitándose durante 18 horas a 25 °C.

Para estudiar la influencia del  $\text{CaCO}_3$ , se suspendió 1,00 gr de  $\text{CaCO}_3$  (Panreac) en 5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y se agitó en las mismas condiciones que en los ensayos del  $\text{CaCl}_2$ . En ambos casos se prepararon muestras en blanco que sólo contenían el reactivo en las mismas concentraciones.

Posteriormente, el sobrenadante fue centrifugado en una centrífuga "Sigma 4-10" durante 10 minutos a 2000 rpm, y el líquido procedente del extracto se decantó en un erlenmeyer. El precipitado obtenido fue lavado con otros 5 ml de reactivo, agitándose nuevamente y centrifugado de forma inmediata, adicionándose a los otros 5 ml previos en el mismo erlenmeyer. En estos 10 ml de extracto total se determinó la materia orgánica total por oxidación con dicromato potásico (MAPA, 1994).

Igualmente se ha estudiado la solubilidad después de cinco días de interacción. Para ello se añadieron 5,00 gr de producto sólido en botes de plástico con 20 ml de agua, ajustando el pH a 5,0 con una solución de HCl 1M y a pH 6,0, 7,0 u 8,0 con NaOH 1M. Los botes, una vez pesados, se mantuvieron termostatizados a 25 °C, en agitación constante, durante 5 días en un baño P-SELECTA Unitronic 320. Pasado este tiempo, fueron filtrados y se tomaron alícuotas de 10 ml de extracto donde se determinó el pH y los contenidos totales Fe por espectrofotometría de Absorción Atómica y materia orgánica total por oxidación con dicromato potásico.

En estas mismas condiciones, se hizo otro ensayo para evaluar la solubilidad durante 10 días, ajustándose diariamente el pH al valor deseado.

### III Caracterización de los productos

#### **1.4 Estudio de su interacción con suelos y materiales del suelos**

Con el fin de determinar la capacidad de movilización del hierro y otros micronutrientes por las sustancias húmicas que componen los fertilizantes objeto de nuestro estudio, se realizó el presente ensayo de interacción del Doliron y Aquamato férrico, con diferentes materiales edáficos y en una mezcla de éstos que denominaremos patrón de suelo y que presenta la composición elemental correspondiente con las medias atribuidas a un suelo calizo (Lindsay, 1979). Asimismo, se aplicó el estudio de interacción con el suelo de Valencia, que posteriormente sería objeto de los ensayos de campo. El método utilizado en los ensayos de interacción fue puesto a punto por Olmos (1993; 1998).

##### **1.4.1. Materiales edáficos**

El ensayo se realizó con los siguientes materiales: ácido húmico, Montmorillonita,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , suelo calizo standard y suelo de Valencia, procedente del ensayo de campo.

El ácido húmico fue suministrado por Fluka (Analysis Number 38537/1992). La Montmorillonita cálcica Stx-1 (blanca) es de Gonzales County, Texas (EE.UU.) y fue proporcionada como material patrón por "Clay Minerals Society Source" Clay Mineral Repository, Departamento de Ciencias Geológicas de la Universidad de Missouri, Columbia, Missouri (EE.UU.). El  $\text{CaCO}_3$  fue obtenido de Panreac (Lot#2311C).

El óxido de Fe se preparó según el procedimiento de Sims y Bingham (1968), precipitando  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Probus) con NaOH ( $\text{Fe}/\text{OH}=3,0$ ) a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se filtró, fue lavado con agua destilada hasta que el valor de la conductividad de las aguas de lavado fue inferior a  $100 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ , y con etanol al 80% hasta obtener un pH en agua próximo a la neutralidad. El precipitado de color pardo rojizo se dejó secar en estufa a  $60^\circ\text{C}$  durante 24 horas y se molió con un mortero hasta conseguir un polvo fino. Los hidróxidos de Cu, Zn y Al se prepararon en el laboratorio a partir del  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Panreac PRS),  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Panreac PRS) y  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  (Panreac PA) mediante un procedimiento similar al anteriormente descrito, aunque el contacto con el agua

### III Caracterización de los productos

de lavado se limitaba a unos minutos. El óxido de Mn se elaboró a partir de permanganato potásico en etanol caliente.

El óxido de hierro sintetizado fue identificado mediante difracción de rayos X en un difractómetro "Siemens A-501", utilizando radiación monocromática de Cu K $\alpha$  ( $\lambda=1,54184 \text{ \AA}$ ). La recogida de datos de intensidad se llevó a cabo cada  $0,04^\circ$  ( $2\theta$ ) con un tiempo de conteo para cada paso de dos segundos. Las condiciones de trabajo fueron de 40 KV y 25  $\mu\text{A}$ , seleccionando rendijas de divergencia de  $1^\circ$  con el fin de asegurar la completa iluminación de la superficie de las muestras  $10^\circ 2\theta$ . El experimento de difracción de rayos-x se realizó a  $20 \pm 1^\circ \text{ C}$ , barriendo un rango de  $2\theta$  entre  $10$  y  $70^\circ$ . En la figura 7 se presenta el difractograma obtenido. En el que se puede comprobar que se obtuvo una fase ferrihidrita de 6 líneas, similar a las descritas por Drist y col (1993).

La determinación de la superficie específica se realizó en un equipo AUTOSORB, mediante degasificación previa de las muestras durante veinticuatro horas y posterior adsorción de  $\text{N}_2$  a  $-196^\circ \text{ C}$ . La superficie específica del material fue  $S_{\text{BET}} = 220 \text{ m}^2/\text{g}$ .

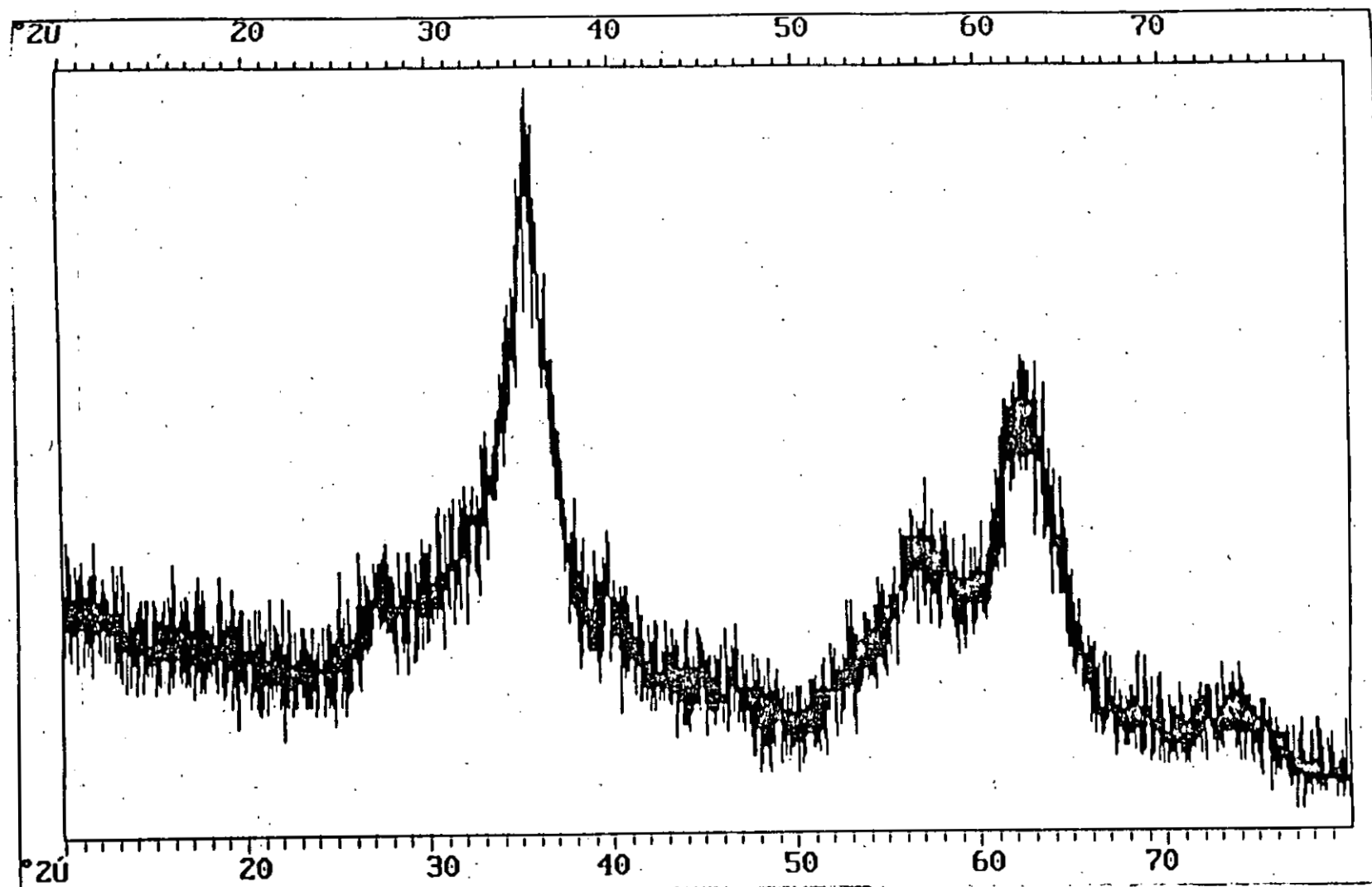
#### **1.4.2. Suelos de uso agrícola. Caracterización.**

Se utilizaron dos suelos; una mezcla de materiales para obtener un suelo de composición conocida, controlada y de características similares a las de un suelo calizo, que se denominará patrón de suelo (Lucena y Bascones, 1993) y un segundo suelo agrícola procedente de Bétera (Valencia) donde se desarrollaba el ensayo de campo sobre cítricos.

Para preparar el patrón de suelo se mezclaron los siguientes materiales de acuerdo con la composición elemental media de suelos calizos descrita por Lindsay (1979): a) 50 % Arena de cuarzo normalizada nº 3 ( $0,5 \text{ mm} < \phi < 1,5 \text{ mm}$ ) lavada al ácido (Instituto Torroja C.S.I.C., Madrid); b) 15 % Arcilla Ca-Montmorillonita Stx-1 (Gonzales County, Texas, EE.UU.); c) 5% Arcilla Illita IMt-2 (Silverhill, Montana, Clay Mineral Repository); d) 2 % Materia orgánica: Turba de Buyos (Tolsá S.A.); 19 %  $\text{CaCO}_3$  (Probus); e) 1% Dolomita y f) 8% Óxidos: 7%  $\text{FeOx}$ , 0,5 %  $\text{AlOx}$ , 0,1%  $\text{MnOx}$ , 0,004%  $\text{CuOx}$ , 0,006%  $\text{ZnOx}$  y 0,9%  $\text{CaHPO}_4$ .

### III Caracterización de los productos

Figura 7: Difractograma de rayos X de la ferrihidrita



### III Caracterización de los productos

El suelo de Valencia fue previamente secado al aire y tamizado 2 mm, y se realizó la caracterización química según los Métodos Oficiales de Análisis para suelos (M.A.P.A.1994).

El análisis granulométrico se hizo por sedimentación según el método del densímetro de Boyoucos. Se determinó pH en pasta saturada de H<sub>2</sub>O y KCl respectivamente y conductividad eléctrica también en pasta saturada.

La materia orgánica se evaluó por oxidación con dicromato potásico en medio sulfúrico y posterior valoración por retroceso con sal de Möhr (sulfato ferroso-amónico).

El contenido en caliza activa se determinó por el método empírico de Galet (1947) y el de caliza total por el método de Williams (Comisión de Métodos Analíticos, 1984). Se hizo una extracción con ABA-DTPA, según el método de Soltanpour y Schwab (1977) para la extracción de macro y microelementos, determinándose posteriormente por espectrofotometría de Absorción Atómica.

Los resultados obtenidos para el análisis del suelo de Valencia se muestran en la tabla 6.

#### **1.4.3 Ensayo de agitación**

El método de interacción utilizado se basó en los estudios previos de Olmos (1993, 1998), donde se estableció como tiempo de interacción óptimo 3 días. La dosis utilizada era análoga a la aplicada en el ensayo campo de Valencia, considerando que la recomendada por el fabricante eran aproximadamente 700 gramos de humato por cada 1000 Kg de suelo. Los productos se adicionaron al suelo mediante bandas, a ambos lados, de cada árbol, con objeto de que su dispersión en campo fuera la menor posible y mayor la asimilación por raíces. En base a estas cantidades y con el propósito de no acumular errores analíticos, se tomaron 0,01 gramos de cada uno de los humatos por gramo de suelo, cantidad que se estimó suficientemente ajustada. A continuación se expone el desarrollo del ensayo.

### III Caracterización de los productos

**Tabla 6** Características del suelo de Valencia

Color (tablas Munsell)	5YR5/GREDYELLOW
Textura:	
Arena (diámetro de partícula 2,00-0,02 mm)%	54
Limo (diámetro de partícula 0,02-0,002 mm)%	22
Arcilla (diámetro de partícula <0,002 mm)%	23
Textura clasificación internacional	Franco arcillo arenoso
pH (saturación suelo/agua)	7,45
pH (saturación, suelo/KCl)	7,16
Caliza tota %	8,3
Caliza activa %	2,6
Nitrógeno Kjeldahl %	0,14
M.O. Oxidable	1,64
C/N	6,79
Fósforo soluble (Olsen, mg·Kg <sup>-1</sup> )	130
Macronutrientes (extracto Soltanpour, cmol <sub>c</sub> ·Kg <sup>-1</sup> )	
K	1,04
Na	0,32
Ca	3,89
Mg	1,05
Micronutrientes (extracto Soltanpour, mg·Kg <sup>-1</sup> )	
Fe	11,6
Mn	2,1
Zn	2,1
Cu	0,8

En botes de propileno de 50 ml se adicionaron cantidades de Dolirón y Aquamato férrico, mezclándose con los siguientes materiales:

- 1 gramo de Montmorillonita caliza standard Stx-1
- 1 gramo de ácido húmico
- 0,5 gramos de Fe(OH)<sub>3</sub>
- 2 gramos de CaCO<sub>3</sub>
- 5 gramos de patrón de suelo calizo
- 5 gramos de suelo de Valencia



### III Caracterización de los productos

Se realizaron tres repeticiones de cada uno de los materiales ensayados, además de los blancos de cada uno de los materiales y suelos, sin adicionar las sustancias húmicas. El sistema se suspendió en 20 ml de agua destilada y se mantuvo, en oscuridad y agitación, durante una hora en baño termostático a 25 °C.

Tras un periodo de incubación de 3 días en oscuridad y a 25 °C, los extractos fueron entonces filtrados y envasados a 25 ml para determinar los macro y micronutrientes solubilizados al cabo de ese tiempo.

Para obtener los nutrientes disponibles para cada material y suelo, se realizó a cada uno de los precipitados tras el ensayo de interacción una extracción para nutrientes en suelos calizos, mediante el método ABA-DTPA (Soltanpour y Schawb, 1977).

Las concentraciones de los macro y micronutrientes, tanto solubilizados como disponibles, fueron determinadas por espectrofotometría de Absorción Atómica. A fin de prescindir del elemento proporcionado por el material, tanto en la solubilización como en la extracción, el porcentaje de incremento en elemento se calculó por la diferencia del valor obtenido para cada muestra con el blanco. De acuerdo con la ecuación 3:

$$\% \text{ incremento} = \frac{[\text{elemento}] - [\text{elemento}]_0}{[\text{elemento}]_0} * 100 \quad (3)$$

donde; [elemento] representa la concentración del elemento ( $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) que se solubiliza o se extrae tras la interacción del fertilizante con el material o el suelo y  $[\text{elemento}]_0$  indica la concentración del elemento ( $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) que se solubiliza o se extrae del material o suelo en ausencia de fertilizante.

## **2. RESULTADOS**

### **1.1. Análisis de los productos según los métodos oficiales**

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos para el análisis químico del Aquamato férrico y del Doliron de acuerdo con los métodos descritos e el punto 1.1 del apartado de materiales y métodos de este tercer capítulo.

Dado el origen del Doliron y del Aquamato férrico, inicialmente se suponían contenidos elevados de materia orgánica. En el caso del Aquamato férrico se confirma esta previsión, alcanzándose valores superiores al 40 % para la materia orgánica calculada por calcinación. Por el contrario, esta proporción se reduce casi a la mitad en el Doliron. Como puede observarse en la tabla 7, la materia orgánica oxidable no coincide con estos mismos valores, siendo considerablemente menores.

El pH del extracto, tanto en agua como en KCl es ligeramente ácido para ambos, lo que facilitaría la absorción del Fe por la planta en terrenos calizos. La conductividad eléctrica en el extracto acuoso es  $1,91 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  para el Aquamato férrico y  $5,25 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  para el Doliron, valores éstos que en principio, permiten sostener que la aplicación del producto no debería ocasionar problemas de salinidad.

En el caso concreto del Aquamato férrico, el porcentaje de materia orgánica obtenido por calcinación es de 44 % y el contenido en N está próximo al 0,8 %. Como resultado la relación C/N de 23 se considera baja lo que favorece la mineralización de los residuos orgánicos y la liberación del N. Mientras que una relación C/N  $\geq 50:1$  produce que como fuente de energía los microorganismos de suelo inmovilicen parcial o totalmente el N del suelo, utilizando el C (Edwards y col, 1995). Existen autores que consideran la relación C/N baja cuando es inferior a 20 (Ahrens y Farkasdi, 1969), sugiriendo niveles superiores a 30 cuando se produce bloqueo biológico del N asimilable del suelo (Stevenson, 1986). En este caso se espera que el N pase a formas inorgánicas disponibles para el cultivo. Según algunos autores el aporte de compost maduros de RSU o mezclas de basuras urbanas

### III Caracterización de los productos

**Tabla 7:** Análisis químico del Aquamato férrico y del Doliron.

		Aquamato férrico	Doliron
Porcentaje de humedad (g·100 g <sup>-1</sup> materia húmeda)		11	30
Porcentaje de cenizas (g·100 g <sup>-1</sup> materia seca)		62,5±0,50	81,4±0,1
Análisis elemental CHN (g·100 g <sup>-1</sup> materia seca)	C	17,5	8,37
	H	2,77	1,43
	N	0,76	0,15
relación C/N		23,0	55,8
Materia orgánica oxidable		20,0±1,1	6,4±0,5
Materia orgánica por calcinación		44,7±0,8	22±1
pH (1/25 en extracto agua)		6,28±0,06	5,82
pH (1/25 en extracto KCl)		6,30±0,02	5,57±0,03
CE (extracto en agua 1:25mS·cm <sup>-1</sup> )		1,91±0,02	5,25±0,01
Macronutrientes totales (g·100 g <sup>-1</sup> materia seca)	Ca	3,08±0,18	12,9±0,8
	Mg	0,206±0,01	4,20±0,2
	K	0,026±0,01	0,053±0,02
	Na	0,162±0,07	0,21±0,13
Micronutrientes totales (g·100 g <sup>-1</sup> materia seca)	Fe	18,01±0,3	5,10±0,4
	Mn	0,0298±0,0006	0,01415±0,0004
	Cu	0,0066±0,004	0,0030±0,0002
	Zn	0,0034±0,0008	0,0019±0,0001
Macronutrientes extraíbles (μg·g <sup>-1</sup> materia seca)	Ca	800	6800
	Mg	330	1240
	K	240	40,4
	Na	88	36,8
Micronutrientes extraíbles (μg·g <sup>-1</sup> materia seca)	Fe	369	425
	Mn	4,15	1,05
	Cu	77,6	27,64
	Zn	2,31	1,676

y lodos residuales con relaciones de C/N inferiores a 20 dan, por lo general, lugar a aumentos significativos de la concentración de N en planta (Terman y Mays, 1973; Duggan y Wiles, 1976), aunque también se ha observado que en semilleros cultivados con tres fuente de N inorgánico diferentes (urea, NH<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>OH) y estiércol para ajustar C/N a valores inferiores a 30 se producían desequilibrios nutricionales de P, Ca y S (Lu y Edwards, 1995).

### III Caracterización de los productos

El Doliron por el contrario presenta una relación C/N que se considera elevada, por lo que no se espera que el N sea fácilmente mineralizable. El contenido de C es bajo para ser considerado como enmienda orgánica, aunque la materia orgánica obtenida por calcinación está alrededor del 20%.

Los dos productos tienen un alto contenido en macro y micronutrientes totales y extraíbles, especialmente Fe, Ca y Mg, pero sin llegar a alcanzar niveles elevados de Zn y Cu. Sin embargo, se observan bajas concentraciones de Mn.

Con relación al contenido en macronutrientes presentes en el Aquamato férrico, las concentraciones de Ca y Mg se pueden considerar elevadas, siendo extraíbles el 2,60% respecto de Ca total, y el 16% respecto del Mg. El contenido de K, no parece muy importante, pero ya hemos indicado en la introducción, que prácticamente todo el K presente en este tipo de compuestos, se considera asimilable por la planta. Son muy valorables los elevados contenidos de Mg y Ca totales reflejados en el Doliron, aunque solamente se extraen el 5 y el 3% del contenido total, respectivamente.

La proporción de Fe total, es muy superior tanto en el Aquamato férrico como en el Doliron al resto de los micronutrientes y se corresponde al 18 % y al 5,25 % del producto total, en cada caso. De estos valores tan sólo el 0,2 % del Fe total en el Aquamato férrico y 0,8% en el Doliron son extraíbles en DTPA (Soltanpour y Schwab, 1979). Esto indica que el Fe se encuentra fuertemente retenido, probablemente a la materia orgánica, lo que dificulta en principio la asimilación por parte de la planta. La absorción de este micronutriente dependerá entre otros factores de su especiación en los productos de partida y la formación de complejos orgánicos de Fe(III) solubles, que impidan la precipitación de los óxidos de Fe y favorezcan las formas móviles disponibles para la planta. El pH del extracto de agua es ligeramente ácido, lo que podría favorecer la liberación de este metal.

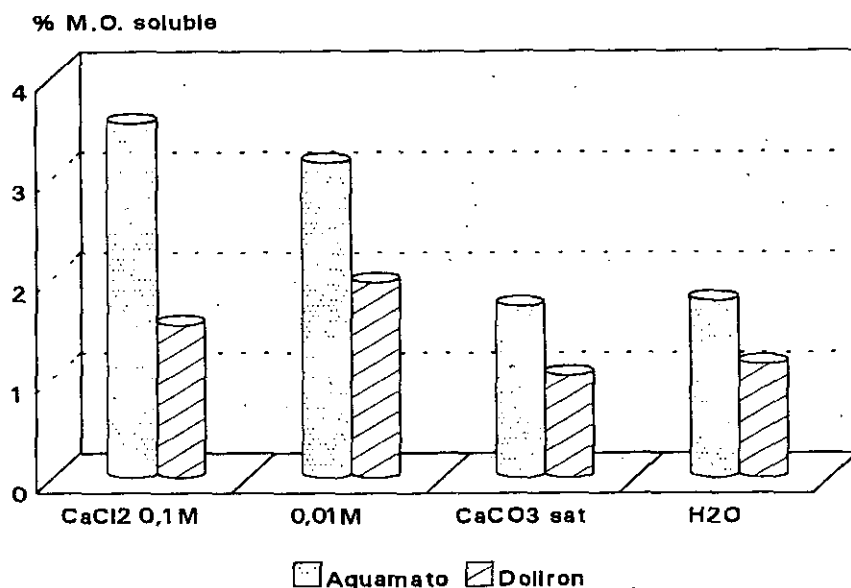
El resto de los micronutrientes, aunque presentan contenidos totales mucho menores al obtenido para el Fe, sí parecen fácilmente asimilables por la planta dado que se extraen en mayor proporción que el Fe. Debe prestarse especial atención al Cu, dado que se extrae el 100%, quizás por su fácil asociación a las fracciones más solubles de la materia orgánica.

### III Caracterización de los productos

#### 2.2. Solubilidad en agua en diferentes condiciones de Ca-pH

En la figura 8 se presentan los resultados obtenidos para los productos ensayados, referidos al porcentaje de materia orgánica soluble en cada uno de los reactivos utilizados. Se puede observar que tanto el Aquamato férrico como el Doliron incrementan el porcentaje de materia orgánica soluble en presencia del  $\text{CaCl}_2$ . Los niveles obtenidos en presencia del  $\text{CaCO}_3$  saturado se mantienen cercanos a los del Aquamato férrico en agua, siendo sensiblemente inferiores para el Doliron.

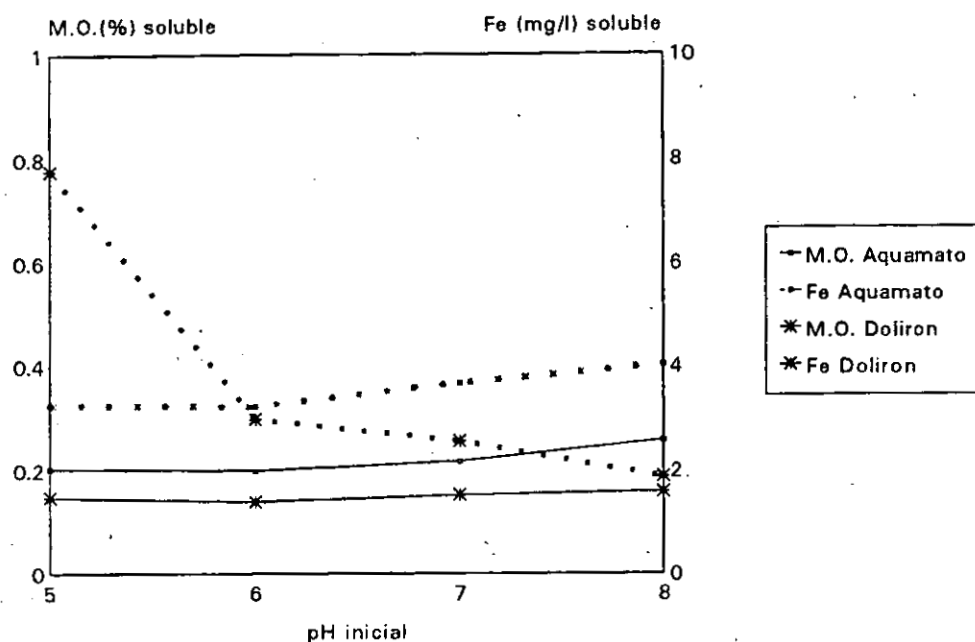
**Figura 8** Solubilidad en agua y diferentes condiciones de Ca-pH



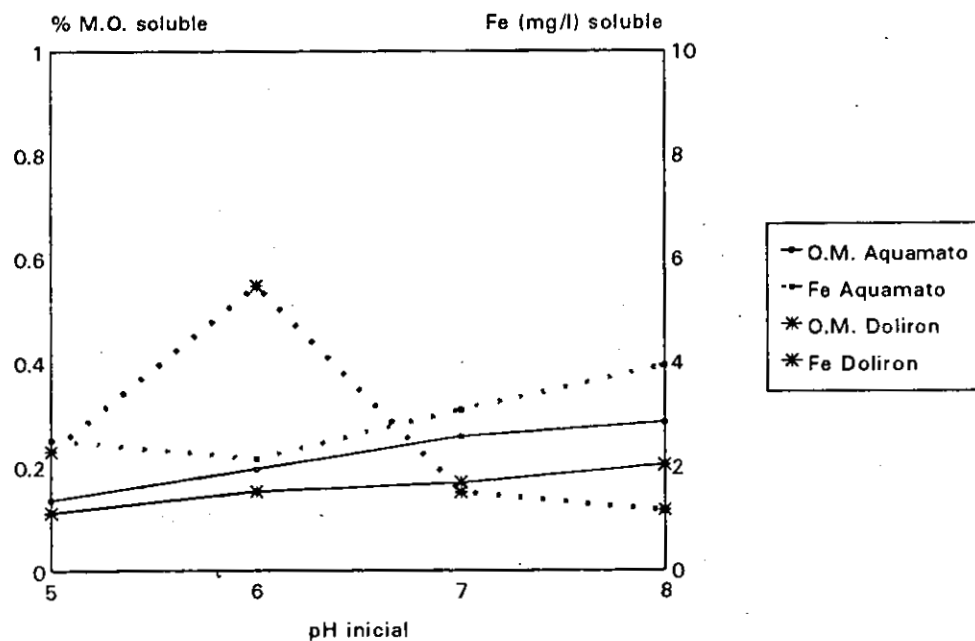
Las figuras 9 y 10 muestran la solubilidad tanto de la materia orgánica (%) como del Fe ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en medio acuoso después de cinco y diez días a diferentes pH. Las tendencias son claras en el Aquamato férrico, donde se incrementa tanto la materia orgánica como el Fe total según aumenta el pH. Por el contrario, aunque sí se percibe un ligero incremento en el Fe liberado por el Doliron que es especialmente notable después de 10 días de interacción, no se observa una mejora tan evidente como la manifestada por el uso de Aquamato férrico.

### III Caracterización de los productos

**Figura 9** Solubilidad de la materia orgánica (%) y del Fe ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) procedentes del Aquamato férrico y Doliron en medio acuoso tras 5 días de interacción a pH 5, 6, 7 y 8.

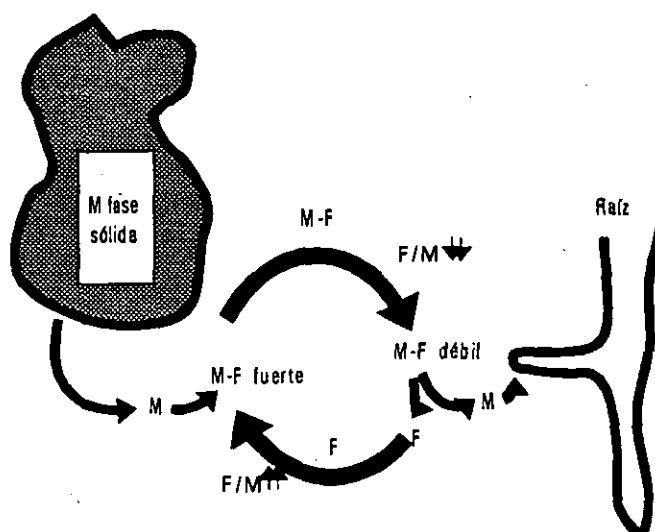


**Figura 10** Solubilidad de la materia orgánica (%) y del Fe ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) procedentes del Aquamato férrico y Doliron en medio acuoso tras 10 días de interacción a pH 5, 6, 7 y 8.



### III Caracterización de los productos

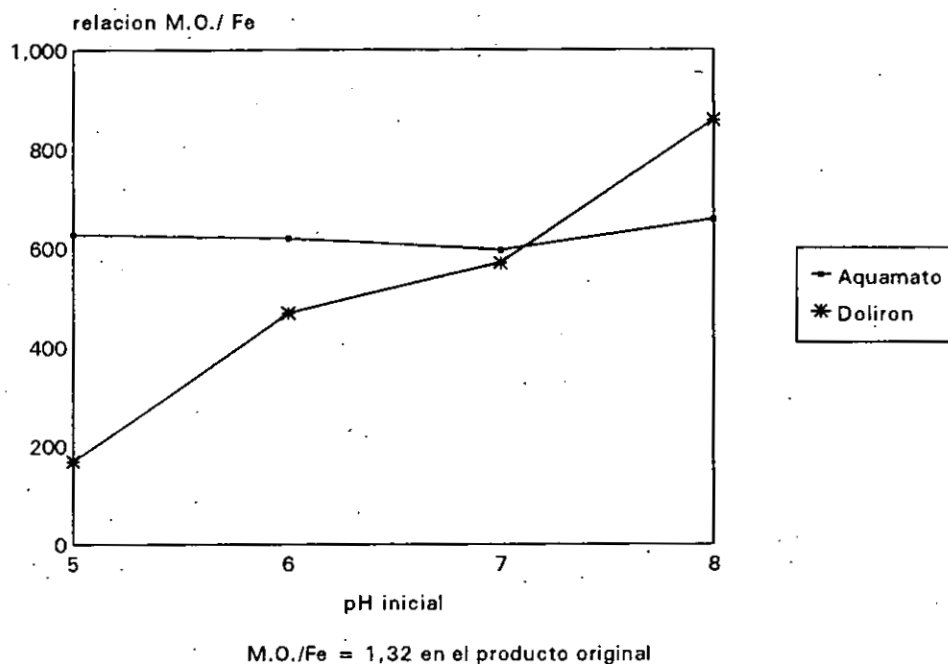
**Figura 11** Mecanismo de transporte por los ácidos fúlvicos a los metales desde la fase sólida a la raíz .



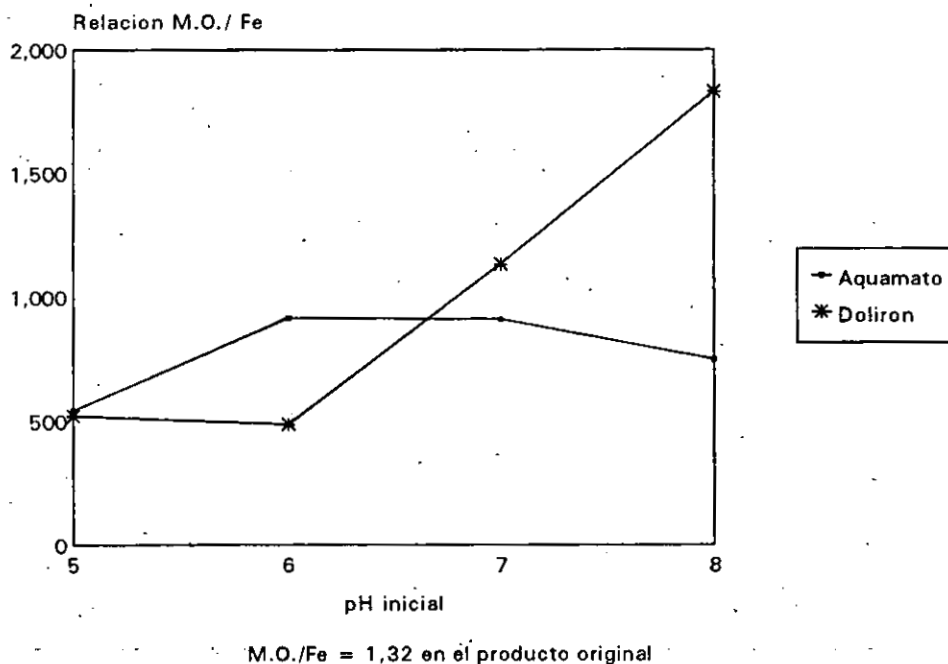
La relación Fe/MO mostrada en la figura 11, describe la capacidad de enlace de los ácidos fúlvicos con iones metálicos (Lucena y Lindsay, 1988; Lucena y De la Torre, 1994). A estos efectos, se considera que un enlace es fuerte cuando la relación metal/ácido fúlvico es baja; de modo opuesto, esta capacidad es débil si existe una elevada concentración de metal ligada al ácido fúlvico. Si consideramos un mecanismo para el transporte de metales desde la fase sólida a la raíz similar al propuesto por Lindsay y Schwab (1982) para quelatos de Fe, según se muestra en la figura 11, reconoceremos la importancia de este transporte de Fe y otros micronutrientes a la raíz. Si el ligando enlazado a baja cantidad de metal acomplejado se aproxima a la fase sólida del suelo, formaría complejos muy estables y el proceso sería muy rápido. Una vez que el complejo tiene una relación Fe/M.O. elevada podría moverse por difusión a la raíz. En estas condiciones, es fácil para la raíz liberar el Fe débilmente enlazado a la materia orgánica, y el ciclo volvería a iniciarse. Este proceso se considera más efectivo que la aplicación de quelatos sintéticos al suelo, a pesar de que sus complejos presentan una constante de estabilidad mayor que los de la materia orgánica. Las sustancias húmicas coloidales también pueden contribuir a estos mecanismos de transporte de Fe a la rizosfera, aunque el movimiento en el suelo de los complejos Fe-húmico sería más lento que el que se produce a través de sus verdaderas formas solubles.

### III Caracterización de los productos

**Figura 12** Relación Fe/MO después de 5 días de interacción del Aquamato férrico y del Doliron en medio acuoso a pH 5, 6, 7 y 8.



**Figura 13** Relación Fe/MO después de 10 días de interacción del Aquamato férrico y del Doliron en medio acuoso a pH 5, 6, 7 y 8.





### III Caracterización de los productos

Las figuras 12 y 13 muestran la relación Fe/MO, después de 5 y 10 días de interacción, respectivamente, en el intervalo de pH que previsiblemente pueden tener los suelos calizos. Considerando que la relación Fe/MO inicial es 1,32 para el Aquamato férrico y 1,25 para el Doliron, se observa que en ambos casos ésta incrementa considerablemente, aunque la influencia del pH es más significativa en el Doliron, que en Aquamato férrico. También es el Doliron el humato que presenta una mayor respuesta con el tiempo. En definitiva, de estos ensayos se puede destacar que tanto el Doliron como el Aquamato férrico son capaces de liberar Fe en condiciones de suelos calizos.

#### **2.3 Estudio de su interacción con suelos y materiales edáficos**

Los resultados procedentes del ensayo de interacción con materiales vienen reflejados en las tablas 8 a la 14. En ellas se muestra el porcentaje de elemento solubilizado o extraído respecto a los blancos, en un intervalo de confianza para  $\alpha = 0,05$ . Estos intervalos de confianza son en algunos casos muy elevados, debido a que la acción de los fertilizantes sobre los materiales produjeron notables incrementos de elemento solubilizado o extraído, y a que los resultados mostraron una importante variabilidad. Debe indicarse que los incrementos encontrados en la solubilización o extracción de los nutrientes estudiados podían alcanzar porcentajes superiores al 1000%. Esto incrementos son atribuibles a la solubilización o extracción del elemento, pero al ser valores relativos es importante el valor de referencia. Cuando la medida se efectúa respecto materiales donde no se produce solubilización o extracción del nutriente, es decir, el contenido del elemento en el extracto es próximo a cero o no es detectable, los incrementos pueden alcanzar los valores ya comentados, dado que este parámetro es el denominador de la ecuación 3. Aún con estas limitaciones, es posible observar con claridad algunas tendencias, a las que nos vamos a referir en las líneas siguientes.

El hierro es, sin lugar a dudas, el elemento que presenta un mayor interés en nuestro estudio, habida cuenta que estos productos pretenden ser utilizados como correctores de la clorosis férrica. Los altos contenidos totales de Fe encontrados en el Doliron y el Aquamato férrico no implican que este elemento se encuentre en forma disponible para ser asimilado por la planta, ya que son las denominadas formas móviles (Uren, 1984),

### III Caracterización de los productos

básicamente  $\text{FeOH}^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_3^0$  y Fe-fulvato, los principales constituyentes del Fe soluble y, por tanto, las que puede proporcionar  $\text{Fe}^{3+}$  a suficiente velocidad como para aportarlo a la planta de forma inmediata.

Tal y como viene recogido en las tablas 8 y 9 se manifestaron incrementos importantes en la solubilización de Fe cuando el Aquamato férrico y el Doliron interaccionaban con el patrón de suelo. En este último humato se aprecian además resultados positivos en la interacción con el suelo de Valencia y el ácido húmico. El incremento tan elevado que se produce es debido a los bajos contenidos de Fe soluble en el extracto del suelo patrón en ausencia de los fertilizantes.

**Tabla 8** Incremento (%) en la solubilización de micronutrientes tras interaccionar el Aquamato férrico con los diferentes materiales edáficos.

	Fe	Mn	Cu	Zn
Montmorillonita	-24,2±1,8	n.s.	n.s.	50±20
Acido húmico	-19,0±3,4	-40±20	n.s.	2000±500
$\text{Fe}(\text{OH})_3$	-86,1±9,6	n.s.	n.s.	510±30
$\text{CaCO}_3$	n.s.	n.s.	20±10	110±90
Patrón de suelo	2300±900	n.s.	550±40	900±200
Suelo de Valencia	n.s.	n.s.	n.s.	100±50

Tanto la montmorillonita como el óxido de Fe favorecieron la retención del Fe cuando se estudiaba el efecto de estos materiales sobre el Aquamato férrico y el Doliron. El  $\text{Fe}^{3+}$  es uno de los principales cationes polivalentes responsable del enlace de los ácidos húmicos y fúlvicos a las arcillas, junto con el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Al}^{3+}$ . Mientras que el primero no se caracteriza por la formación de fuertes complejos de coordinación, las uniones entre las arcillas y los ácidos fúlvicos y húmicos a través del  $\text{Fe}^{3+}$  y el  $\text{Al}^{3+}$  son muy estables, y para desplazar el metal enlazado es necesaria la presencia de un agente quelante más fuerte (Stevenson, 1994). Los mecanismos de adsorción pueden de dos tipos: por atracción electrostática mediante puentes de hidrógeno con el anión orgánico, o un segundo tipo por intercambio de ligando, según el cual el ligando orgánico se enlaza a un catión, previo

### III Caracterización de los productos

desplazamiento de una molécula de agua de hidratación. Pero cuando los minerales de la arcilla están rodeados de óxidos sus superficies de reacción están dominadas más por estos compuestos que por las arcillas. En esta ocasión se pueden producir indistintamente fuertes enlaces de coordinación o de intercambio aniónico. Este caso es especialmente notorio en presencia de óxidos de Fe(III). Los materiales húmicos pueden interaccionar con los óxidos de manera similar. Parfitt y col. (1977) describieron que la adsorción del ácido fúlvico sobre las superficies del óxido se acompañaba del desplazamiento de grupos OH por iones  $\text{COO}^-$ , lo que indicaba el intercambio de ligando.

**Tabla 9** Incremento (%) en la solubilización de micronutrientes tras interaccionar el Doliron con los diferentes materiales edáficos.

	Fe	Mn	Cu	Zn
Montmorillonita	-94±4	24±7	n.s.	-25±8
Acido húmico	90±60	-40±20	n.s.	1500±700
Fe(OH) <sub>3</sub>	-70±8	n.s.	n.s.	n.s.
CaCO <sub>3</sub>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Patrón de suelo	2000±1000	n.s.	n.s.	1390±10
Suelo de Valencia	6000±2000	n.s.	n.s.	180±90

En el caso que nos ocupa, tanto el Doliron como el Aquamato férrico presentan cantidades importantes de materia orgánica y hierro. En presencia de la montmorillonita, la formación del complejo húmico arcilla a través del  $\text{Fe}^{3+}$  impediría la solubilización del metal. Mientras que si la interacción se valora sobre el óxido de hierro, la unión podría realizarse mediante la materia orgánica según describe Parfitt y col (1977). En los dos casos, la formación de complejos estables favorece la retención.

Por último cabe destacar los diferentes resultados observados en incremento de la solubilización de Fe tras la interacción del Aquamato férrico y el Doliron con el ácido húmico, recogido en las tablas 8 y 9. En el primer supuesto, los resultados reflejan la retención del metal, mientras que en el segundo se produce la solubilización. Esto nos induce a pensar que el Aquamato férrico forma complejos más estables con la materia

### III Caracterización de los productos

orgánica que el Doliron, y puede presentar posiciones vacantes para seguir formando complejos.

Como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos de este capítulo, se aplicó un extractante ABA-DTPA al residuo resultante de la interacción, con el objeto de solubilizar el hierro restante y de esta forma valorar el porcentaje de elemento extraíble y asimilable por la planta. Los resultados para el incremento de los micronutrientes extraíbles tras aplicar el método Soltanpour y Schwab (1977) al residuo resultante de la interacción del Aquamato férrico y del Doliron con los diferentes materiales edáficos, vienen reflejados en las tablas 10 y 11.

**Tabla 10** Incremento (%) micronutrientes extraíbles tras aplicar el método Soltanpour y Schawb (1977) al precipitado resultante de la interacción del Aquamato férrico con los diferentes materiales edáficos.

	Fe	Mn	Cu	Zn
Montmorillonita	n.s.	400±100	n.s.	n.s.
Acido húmico	>1500	50±20	230±20	50±10
Fe(OH) <sub>3</sub>	5,1±2,5	48±5	-20±10	-37±2
CaCO <sub>3</sub>	n.s.	4200±700	1400±400	400±200
Patrón de suelo	26,4±9,6	-30±10	140±70	200±100
Suelo de Valencia	-44,1±3,8	-63±2	-40±20	40±20

El efecto sobre el Fe disponible es más favorable en presencia del Aquamato férrico que con el Doliron. Estos incrementos son muy pequeños, especialmente en el caso de la interacción del Aquamato sobre el hidróxido férrico, donde se manifiesta un ligero incremento en el porcentaje de Fe extraíble, indicando la presencia de complejos menos estables que pueden ser desplazados o hierro más disponible que quizá suplir los requerimientos de la planta. Esta disponibilidad mejora en presencia de hidróxido férrico y especialmente tras la interacción del Aquamato férrico con el patrón de suelo. También se observan incrementos con relación al metal disponible tras la extracción sobre el Doliron y el Aquamato férrico con la montmorillonita, pero en este caso los datos no reflejan unos incrementos tan notables como los valores relativos. Otro caso similar al de la

### III Caracterización de los productos

montmorillonita es el incremento de Fe tras la aplicación del Doliron con el  $\text{CaCO}_3$ . Tampoco los incrementos revelan los contenidos totales, pero se producen. Para situar las cifras que manejamos, el contenido de hierro tras la aplicación del método Soltanpour al  $\text{CaCO}_3$  es de  $0,33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que la concentración de este elemento tras la extracción al residuo que contenía el Doliron son  $2,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Tabla 11** Incremento (%) micronutrientes extraíbles tras aplicar el método Soltanpour y Schawb (1977) al precipitado resultante de la interacción del Doliron con los diferentes materiales edáficos.

	Fe	Mn	Cu	Zn
Montmorillonita	$340\pm10$	$115\pm30$	$27,6\pm9,9$	$200\pm100$
Acido húmico	$>1500$	$40,4\pm9,7$	$100\pm90$	$70\pm30$
$\text{Fe}(\text{OH})_3$	n.s.	n.s.	$-20\pm5$	$-60\pm10$
$\text{CaCO}_3$	$800\pm300$	$1300\pm300$	n.s.	$200\pm60$
Patrón de suelo	n.s.	$-21,9\pm6,6$	$20\pm10$	$40\pm10$
Suelo de Valencia	$30\pm10$	$-56\pm3$	$-55\pm5$	$-30\pm5$

La influencia de estos productos en el aporte y movilización de Fe, no es tan elevada como cabría esperar de su elevado contenido en Fe, exceptuando en el patrón de suelo, donde si se observa incremento importante del elemento soluble y del extraíble, aunque este último solo en el caso del Aquamato férrico. En presencia de altos niveles de Fe, como es el caso de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  los complejos que forma con la materia orgánica son bastante estables y la presencia de un agente quelante fuerte, como es el DTPA, no afecta a su disponibilidad. Sin embargo, cuando su solubilidad se ve afectada por la presencia de arcillas o materia orgánica en suelos, reteniéndose por la formación de agregados o complejo arcilla-metal húmico, el complejo es suficientemente inestable para ser afectado por la presencia de un agente quelante débil.

En las condiciones del suelo de Valencia, caracterizado por un contenido importante de Fe y materia orgánica, se manifiestan diferentes efectos de los humatos sobre la solubilización y disponibilidad del hierro. Cuando en el Aquamato férrico se evalúa el hierro soluble, no se aprecia ningún incremento respecto al del material, y además los complejos

### III Caracterización de los productos

son muy estables, pues el contenido de Fe disponible disminuye respecto al extraído del material. Sin embargo, en presencia del Doliron no sólo se observa un incremento destacable del Fe soluble, sino que además también lo hace su disponibilidad. A la vista de estos resultados, el Doliron debería ser más positivo que el Aquamato férrico para suplir la deficiencias de Fe en plantas cultivadas en un suelo igual o similar al de Valencia.

**Tabla 12** Incremento (%) en la solubilización de macronutrientes tras interaccionar el Doliron con los diferentes materiales edáficos

	Ca	K	Mg	Na
Montmorillonita	n.s.	30±10	1000±200	200±20
Acido húmico	n.s.	n.s.	130±80	n.s.
Fe(OH) <sub>3</sub>	n.s.	150±90	88700±400	130±10
CaCO <sub>3</sub>	1300±300	100±60	9000±2000	n.s.
Patrón de suelo	180±40	30±8	340±90	20±6
Suelo de Valencia	40±30	30±10	160±10	22,1±0,99

El resto de los micronutrientes, tanto solubles mostrados en la ya indicadas tablas 8 y 9, así como extraíbles, recogidos en las tablas 10 y 11, se detallarán a continuación.

El efecto de la materia orgánica sobre la complejación del Mn debe ser considerado con relatividad. Si bien tiene una elevada capacidad para acomplejar el Mn, el Mn orgánico solamente es importante en aquellos suelos donde existe un contenido apreciable en materia orgánica. En comparación con otras trazas metálicas, el Mn no se puede definir como fuerte o débilmente acomplejado por la materia orgánica (Bloom y Mc Bride 1979), por lo que su comportamiento dependerá de otros factores. La solubilización del Mn tras la interacción del Aquamato férrico con los materiales edáficos no es destacable, a excepción de una ligera retención sobre el ácido húmico tal y como viene indicado en la tabla 8. En el Doliron, el Mn se solubiliza de todos los materiales, a excepción del ácido húmico (tabla 9). El Mn extraíble se extrae de todos los materiales y se retiene en los dos suelos, tal como se recoge en las tablas 10 y 11.

### III Caracterización de los productos

No se refleja influencia sobre la solubilidad del Cu ya que todos los valores obtenidos en el ensayo de determinación del elemento soluble en todos los materiales, son próximos al blanco ( tablas 8 y 9). Ahora bien, donde es más evidente la influencia del Cu es en el elemento extraíble. Este se incrementa en todos los casos, excepto con el suelo de Valencia, el hidróxido férrico y montmorillonita. Siendo, además, estas diferencias mayores cuando se aplica el Aquamato férrico que cuando el producto utilizado es Doliron (tabla 11).

Respecto del Zn, se observa una influencia relevante que, como en el caso del Cu, es superior con el Aquamato férrico. El elemento soluble se incrementa en todos los casos, sobre todo en el patrón de suelo y ácido húmico, y no lo hace frente a las arcillas. Asimismo, el Zn extraíble se incrementa todos los casos, a excepción del  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ .

Los resultados obtenidos para el incremento en la solubilización de macronutrientes tras interaccionar el Aquamato férrico o el Doliron con los diferentes materiales edáficos se recogen en las tablas 12 y 13. El incremento de macronutrientes extraíbles tras aplicar el método Soltanpour y Schawb (1977) al residuo resultante de la interacción del Aquamato férrico y Doliron con los diferentes materiales edáficos se muestra en las tablas 14 y 15.

La solubilidad del Ca, tablas 12 y 13, se incrementa en general para todos los materiales y suelos estudiados tratados con Aquamato férrico y Doliron, exceptuando el ácido húmico y la montmorillonita para el Aquamato férrico. Tampoco se observa una respuesta directa del Doliron en suelo de Valencia en relación con este elemento (tabla 13). Siendo los valores obtenidos en estas condiciones próximos al blanco. Por lo que se refiere al Ca extraíble, tablas (14 y 15), se observa retención en suelos y Montmorillonita, probablemente como consecuencia de la formación de agregados estables. Los incrementos más importantes para ambos casos se muestran en el ácido húmico y el  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  cuando se aplica el Doliron.

Aunque respecto del potasio se ponen de manifiesto incrementos muy elevados del elemento soluble (tablas 12 y 13) los valores obtenidos son muy próximos a los encontrados para el blanco, lo que permite deducir que existe mucha variabilidad en los resultados,

### III Caracterización de los productos

especialmente en el caso del Doliron. Por lo tanto no se han considerado estas variaciones suficientemente representativas.

**Tabla 13** Incremento (%) en la solubilización de macronutrientes tras interaccionar el Aquamato férrico con los diferentes materiales edáficos

	Ca	K	Mg	Na
Montmorillonita	n.s.	80±40	n.s.	70±20
Acido húmico	-21±3	40±20	n.s.	-15±4
Fe(OH) <sub>3</sub>	110±20	n.s.	n.s.	120±30
CaCO <sub>3</sub>	1160±80	n.s.	530±20	4±1
Patrón de suelo	25,1±5,6	50±20	n.s.	n.s.
Suelo de Valencia	14,1±5,8	8,2±0,8	17,5±3,7	3±2

Igualmente, se ha observado un ligero incremento del K extraíble, respecto al patrón de suelo, tanto si el producto añadido es Aquamato férrico, indicado en la tabla 14, como si lo es el Doliron, mostrado en la tabla 15. Aunque es cierto que se observa una ligera retención en el suelo de Valencia. El resto de los valores en materiales son próximos al blanco.

**Tabla 14** Incremento (%) macronutrientes extraíbles tras aplicar el método Soltanpour y Schawb (1977) al precipitado resultante de la interacción del Aquamato férrico con los diferentes materiales edáficos.

	Ca	K	Mg	Na
Montmorillonita	-11±8	100±60	42±6	-30±10
Acido húmico	60±10	161±4	29±8	n.s.
Fe(OH) <sub>3</sub>	90±50	n.s.	n.s.	-19±3
CaCO <sub>3</sub>	3,0±0,14	n.s.	n.s.	-40±10
Patrón de suelo	-3,64±0,2	80±20	20±10	n.s.
Suelo de Valencia	17±7	-30±10	-40±20	-40±20

Pasando a referirnos al magnesio soluble, después de haber aplicado Aquamato férrico (tabla 12) no se ha constatado que se vea afectado, excepto un incremento en el suelo de Valencia y en el CaCO<sub>3</sub>. Sin embargo, el Doliron (tabla 13) produce importantes



### III Caracterización de los productos

incrementos generalizados de este elemento. Los niveles obtenidos en todos los materiales y en los dos suelos han de ser interpretados en el sentido de considerarlo como un aporte exclusivo de Mg nativo del producto. El  $Mg^{2+}$  es un catión poco ácido, por consiguiente bastante estable en medio acuoso.

**Tabla 15** Incremento (%) macronutrientes extraíbles tras aplicar el método Soltanpour y Schawb (1977) al precipitado resultante de la interacción del Doliron con los diferentes materiales edáficos

	Ca	K	Mg	Na
Montmorillonita	-25±8	n.s.	60±20	-65±8
Acido húmico	40±10	40±20	480±30	26±2
Fe(OH) <sub>3</sub>	490±20	170±70	760±40	-28±9
CaCO <sub>3</sub>	7±5	900±300	680±90	58±8
Patrón de suelo	-4,0±1,3	21,6±0,6	30±20	-10±6
Suelo de Valencia	-16±7	-40±9	18±3	-14±9

Con relación al Mg extraíble, se observa en este caso un aumento respecto a los blancos en los dos productos. No obstante, los incrementos hallados en el Aquamato férrico son más ligeros como se recoge en la tabla 14, especialmente cuando se trata de la Montmorillonita y el patrón de suelo. Los datos obtenidos con la aplicación en el suelo de Valencia muestran importantes incrementos en aquellos casos donde fue aplicado el Doliron (tabla 15) siendo menos importantes, sin embargo que los alcanzados con el Mg soluble.

Por último, nos ocuparemos del sodio que es un elemento que en altas concentraciones puede causar problemas de salinidad, lo que exige que debe ser controlado. Con relación a la solubilización de Na no se aprecian importantes modificaciones respecto al blanco cuando se aplica el Aquamato férrico a los dos suelos y materiales estudiados, (tabla 12) exceptuando la aplicación sobre el Fe(OH)<sub>3</sub> y la montmorillonita. En estos dos últimos materiales se observa un incremento del elemento soluble. Similar comportamiento aparece en las aplicaciones de Doliron (tabla 13) aunque con un ligero incremento del Na solubilizado en suelos, tanto en el patrón, como en el suelo de Valencia.

El elemento extraíble presenta valores próximos al blanco en todos los casos y en

### III Caracterización de los productos

las dos aplicaciones (tablas 14 y 15). En consecuencia, no cabe predecir, en principio, problemas derivados del exceso de sodio en suelos, por el empleo de cualquiera de estos dos productos, salvo en el caso en el que los contenidos de materia orgánica sean muy elevados, pero nótese que no es este el objetivo al que se proyecta la utilización de este tipo de materiales.

*De los resultados expuestos podemos indicar que la presencia Fe y materia orgánica influye decisivamente en el comportamiento de macro y micronutrientes solubles y disponibles tras la interacción del Aquamato férrico y el Doliron con los materiales del suelo. Esta influencia se manifiesta en las arcillas con la retención de Fe soluble y el incremento del Na y K soluble, consecuencia de la formación de complejos férricos más estables. En el resto de los elementos sólo se observa efecto sobre el contenido en Zn soluble que refleja un incremento esperado, dada la menor estabilidad de sus complejos. Con relación al elemento extraíble sobre este material, la tendencia indica la retención de los iones tri y divalentes, a excepción del Mn y Mg. En el caso particular del Doliron se deben considerar los elevados contenidos de Mg y Ca nativos que dan lugar a incrementos del elemento soluble y del extraíble, independientemente del tipo de material, especialmente significativos en el caso del Mg.*

*La conclusión más destacable de la interacción de los dos productos sobre el  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , fue la retención de Fe con el aquamato férrico hecho ya mencionado y consecuencia de la adsorción de la materia orgánica sobre la superficie del óxido. La segunda conclusión, es la solubilización del Ca y el Zn que, como ya se ha comentado, forman complejos menos estables. Además, en el caso concreto del Doliron se aprecia de nuevo solubilización del Mg. Los datos obtenidos respecto la medida de elemento extraíble tras la interacción del Aquamato férrico sobre los óxidos de hierro, revelan la existencia de posiciones más lábiles donde el Fe puede ser desplazado por un agente quelante fuerte, tal y como indica el incremento en el contenido de Fe extraíble. También aumenta la disponibilidad del Mn y del Ca, sin embargo, la presencia de los óxidos de hierro no beneficia a la disponibilidad del Zn. Este último elemento sí se ve incrementado cuando el producto es el Doliron.*

### III Caracterización de los productos

*A excepción del Ca y el Zn soluble, el resto de los macro y micronutrientes no se solubilizan tras la interacción del Aquamato férrico con el carbonato cálcico. Los elevados pH favorecen la formación de los complejos metálicos con la materia orgánica, muy estables como revelan los resultados de la posterior aplicación al residuo de un extractante Soltanpour y Schawb (1977). Sin embargo, aunque se aprecia la retención del Fe soluble tras la interacción del Doliron sobre el carbonato cálcico, el Fe disponible aumenta en esta ocasión, de la misma forma que lo hacen los micronutrientes.*

*El Aquamato férrico parece alcanzar los resultados adecuados a nuestro objetivo tras su interacción sobre patrón de suelo. Tanto el Fe soluble como el extraíble se ven favorecidos, de forma análoga al resto de los micronutrientes, a excepción del Mn extraíble. Merece ser destacada la retención que se observa en el Ca extraíble.*

*Es en el suelo de Valencia donde el Doliron aparece como el más efectivo, con relación a la disponibilidad del Fe. La formación de complejos solubles afecta a todos los macrominerales y únicamente a un micronutriente el Zn, pero en presencia de ABA-DTPA se incrementan el resto de los micronutrientes y el Ca. En estas mismas condiciones se favorece, asimismo, la formación de complejos insolubles y estables de Fe, Cu y Mn en presencia de Aquamato férrico.*

**IV. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN Fe-  
MATERIA ORGÁNICA POR  
CROMATOGRFIA DE PERMEACIÓN  
SOBRE GEL**

#### **IV Interacción Fe-materia orgánica**

Se ha utilizado la cromatografía de permeación sobre gel para estudiar las interacciones metalo-húmicas, basándose en el hecho de que los complejos formados entre los metales y las macromoléculas se excluyen en mayor o menor extensión del gel, mientras que los metales libres penetran completamente en él, permitiendo de esta forma la separación de los dos (Mantoura y Riley, 1975). Por otra parte, la distribución de estos complejos en el gel en función de sus pesos moleculares y el posterior análisis de las fracciones, hace posible caracterizar el comportamiento químico del metal frente a la sustancia húmica (Kuiters y Mulder, 1991).

Con el fin de estudiar la interacción de Fe con la fracción orgánica del Aquamato férrico y sus posibles implicaciones en el aporte de Fe a la planta, se diseñó un experimento de fraccionamiento por cromatografía de permeación sobre gel. Se ensayaron dos extracciones, una en medio básico y otra en medio acuoso. A través de la extracción alcalina se obtiene toda la fracción orgánica soluble en medio básico, y el hierro asociado o adsorbido a ella. La extracción en medio acuoso permite, por su parte, la caracterización de los complejos de hierro solubles en agua.

## **1. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.1. Extracto alcalino**

#### **1.1.1. Extracción alcalina**

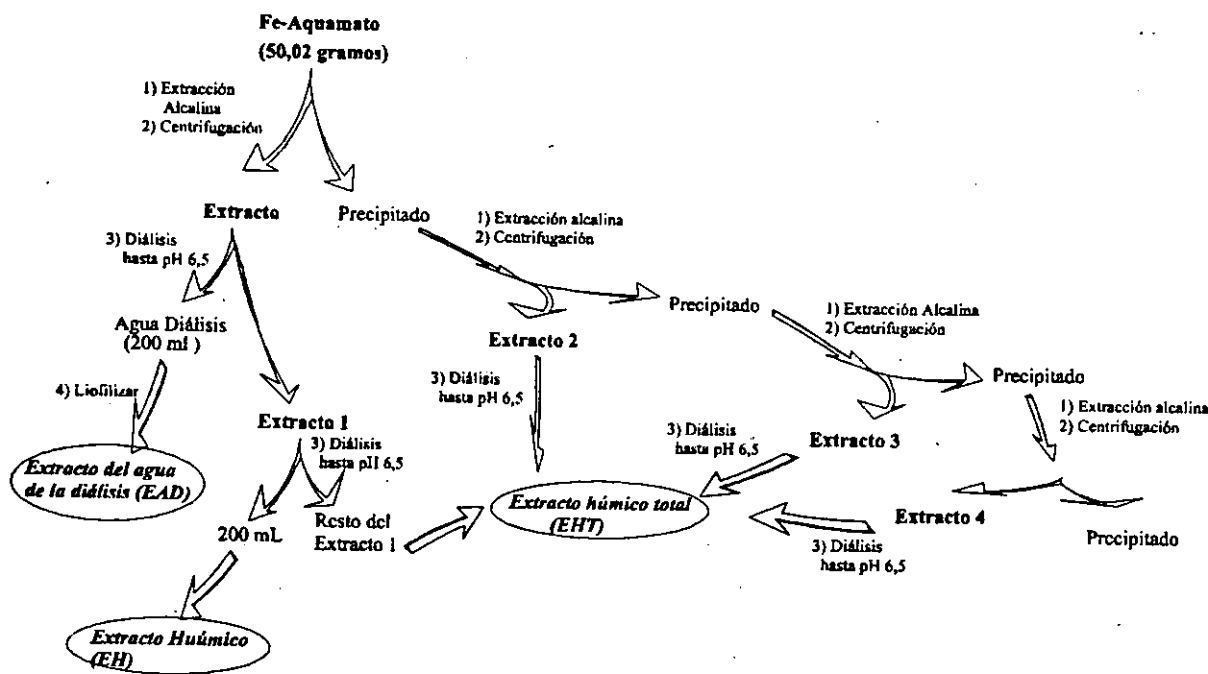
El Aquamato férrico se secó en estufa de aire forzado a 50°C durante una noche. Posteriormente fue molido manualmente con un mortero de porcelana y se pasó a través de un tamiz de 2 mm de diámetro. Para obtener el extracto orgánico total, se añadieron 50,02 g del Aquamato férrico a 500 ml de NaOH 0,1 M (reactivo analítico). La elección de este extractante se fundamentó en su mayor efectividad, ya que permite obtener aproximadamente dos terceras partes de la materia orgánica (Stevenson, 1994). Es conocido, no obstante, que cuanto más alcalinas sean las condiciones y el período de tiempo consumido en la extracción, mayores serán los cambios químicos que se producen en el

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

material extraído (Brenner, 1950). Para minimizar estos cambios químicos, especialmente aquellos que se pueden producir debido a la autooxidación, la solución NaOH se burbujó con N<sub>2</sub> durante una hora.

La extracción alcalina, como muestra la figura 14, se realizó durante 12 horas, en constante agitación magnética y burbujeando intermitentemente  $N_2$  gas. Al cabo de ese tiempo, la solución fue centrifugada durante 15 minutos a 3000 rpm, guardándose el sobrenadante. Sobre el precipitado se practicaron cuatro extracciones sucesivas. Cada extracción se lavó separadamente en tubos de diálisis Visking (Medicell International Ltd. Size 10 Int. Dia. 31,7 mm) hasta que el pH del agua de los lavados se aproximó al del agua Millipore (aprox 6,5), dándose en este momento por eliminados los iones  $Na^+$ .

**Figura 14** Esquema de la extracción alcalina



En la primera extracción, se necesitaron un total de dos semanas, con cambios de agua de la diálisis con una frecuencia de media hora. Para las tres últimas extracciones, el lavado fue mas rápido consumiéndose sólo una semana. Todas las soluciones obtenidas tras la diálisis se unieron, dándoles la denominación de *Extracto húmico total (EHT)*. También

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

se mantuvieron (500 ml) de la primera extracción alcalina, a la que se denominó *Extracto húmico (EH)*.

Un volumen del extracto húmico total (400 ml) se congeló con N<sub>2</sub> líquido y se liofilizó durante una noche, dando lugar a 310 mg de sólido procedente del *extracto húmico total (EHT)*, así denominado para facilitar la descripción del ensayo.

Durante la diálisis del extracto húmico total, principalmente en los primeros lavados y cuando el pH del agua de la diálisis superaba el valor de 9,5, se observó una coloración amarilla en el líquido que atravesaba la membrana. Esta coloración, en principio no deseada, podría corresponder a complejos de hierro o ácidos fúlvicos que presenten un tamaño molecular menor al tamaño del poro de la membrana. Para conocer la naturaleza del material y sus posibles asociaciones con el hierro, se tomaron 200 ml de esta solución y se liofilizaron, previamente congelada con N<sub>2</sub> líquido. De este proceso se obtuvieron 4 mg de sólido al que se denominó *extracto del agua de diálisis (EAD)*. No se observaron más pérdidas por coloración del agua de lavado a pH inferiores de 9,5.

##### **1.1.2 Caracterización del extracto húmico total sin fraccionar.**

Previo al fraccionamiento, se realizó el estudio de caracterización del extracto húmico total (EHT) atendiendo a sus características espectroscópicas, análisis elemental y contenido total de Fe. Un esquema de las operaciones realizadas se muestra en la figura 14.

El sólido procedente de la liofilización del extracto húmico total (10 mg) se disolvió en 25 ml de NaOH 0,1M, obteniéndose su espectro de absorción uv/visible entre 200 y 800 nm y se calculó la relación  $E_4/E_6$ . El espectrofotómetro utilizado fue un aparato Shimadzu UV-160A UV.

El contenido en Fe total se midió por absorción atómica, para lo cual se tomaron 1 ml de la disolución alcalina anterior y se añadieron 10 ml de HCl 1:1.

La absorción en el infrarojo del EHT se midió en un espectrofotómetro BRUKER-

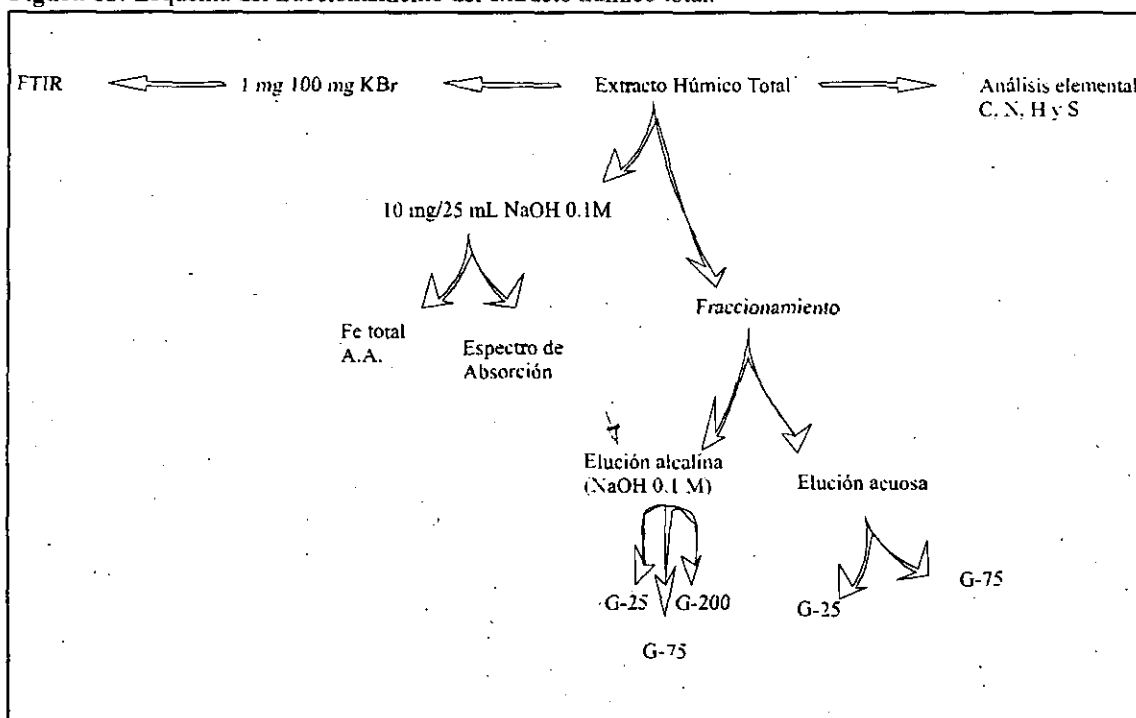
#### IV Interacción Fe-materia orgánica

IFS66V. Se partió de 1 mg de muestra sólida y 100 mg KBr, previamente desecado. La mezcla se trituro finamente en un mortero de ágata y se comprimió en un troquel especial a una presión de 700 a 1000 Kg·cm<sup>-2</sup> para obtener un disco transparente, que se colocó en el haz del instrumento para su análisis espectroscópico. Tanto el mortero de ágata como el troquel, se lavaron previamente con metanol, para evitar las interferencias resultantes que a menudo presentan bandas a 3450 y 1640 cm<sup>-1</sup>, debidas a la humedad. Separadamente se realizó el análisis elemental de C, H, N y S con un aparato Perkin Elmer CHNSO Analyzer 240 III.

##### 1.1.3. Ensayos de fraccionamiento.

En los ensayos de fraccionamiento del material orgánico, todo el material de vidrio se lavó cuidadosamente con jabón especial para uso de laboratorio, aclarándose posteriormente con agua destilada. Se dejó durante una noche con HNO<sub>3</sub> al 2% (reactivo para análisis), para eliminar todas las posibles trazas metálicas, volviéndose a aclarar con agua destilada y durante dos horas en agua Millipore. El material de vidrio se dejó secar en una estufa a 30° C, y una vez seco se tapó con plástico hasta su utilización.

Figura 15: Esquema del fraccionamiento del extracto húmico total.





#### IV Interacción Fe-materia orgánica

El esquema de los ensayos de fraccionamiento para el extracto húmico total viene dado en la figura 15, mientras que otro esquema general para la cromatografía de gel y las posteriores determinaciones en cada fracción pueden verse en la figura 16.

Como se describe en la figura 15, se realizaron dos ensayos de fraccionamiento por Cromatografía de permeación sobre gel del extracto húmico total, utilizando dos eluyentes diferentes, agua y NaOH 0,1M. Cuando el eluyente seleccionado fue el agua, se utilizaron Sephadex G-25, G-75 y G-200. En la elución alcalina el fraccionamiento sólo se realizó con Sephadex G-25 y G-75.

En cada una de las fracciones obtenidas se midió el contenido en Fe total por espectrofotometría de A.A., y se realizaron los espectros de absorción y FTIR, tal y como se recoge en la figura 16.

##### *1.1.3.1. Fraccionamiento del Extracto húmico en Sephadex G-75*

Este primer ensayo de fraccionamiento se realizó con el *Extracto húmico* líquido, procedente de la primera extracción alcalina con el nombre extracto húmico, así se denominó a la alícuota de la primera extracción alcalina, ver figura 14, que se conservó a fin de caracterizar los complejos metalo húmicos que se extraen inicialmente.

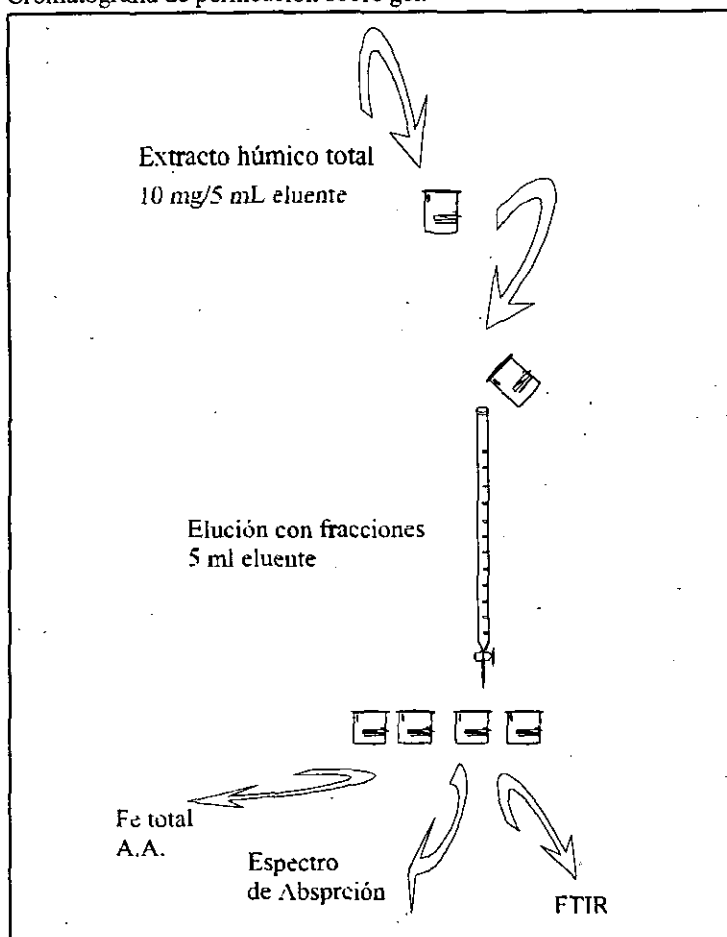
Para este primer ensayo de fraccionamiento, se escogió Sephadex G-75 (Pharmacia Fine Chemicals), capaz de separar moléculas con pesos moleculares comprendidos entre 1.000 y 50.000 daltons. Se preparó una columna de vidrio con Sephadex G-75 (2,5 cm x 30 cm de Sephadex, volumen de exclusión 37 ml), previamente empaquetado con agua de Millipore. El volumen de exclusión de la columna se determinó con Dextrano azul (Pharmacia Fine Chemicals). Se tomaron un total de 24 fracciones. Las numeradas de 1 a 4 contenían un volumen de 10 ml, mientras que las fracciones 5 a 24 contenían 5 ml, tomándose un volumen total de 140 ml.

Con posterioridad al fraccionamiento, se realizaron los espectros de absorción en las regiones ultravioleta (200-350 nm) y visible (400-800 nm) de cada una de las fracciones,

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

(UNICAM UV2-100 uv/visible spectrophotometer v3.32). Se usaron la absorción a 465 nm y la relación  $E_4/E_6$ , a fin de realizar análisis cuantitativo y caracterizar los ácidos fúlvicos y húmicos, respectivamente.

**Figura16:** Esquema de los ensayos de fraccionamiento por Cromatografía de permeación sobre gel.



Se tomó una alícuota de 2 ml de cada fracción que fue liofilizada para realizar su correspondiente espectro de infrarojo con Transformada de Fourier en un aparato Biorad digital division SPC-3200. Las muestras se prepararon como se ha indicado en el apartado 1.1.2 de este capítulo, para la determinación del espectro de infrarojo.

Debido a que no se pudo medir el Fe, se realizó un segundo fraccionamiento para determinar el Fe total contenido en cada fracción. Se utilizó la misma columna y condiciones cromatográficas,

sólo que en este caso se recogieron las bandas completas que presentaban el mismo color. Como consecuencia, cada fracción presentaba diferentes volúmenes.

El Fe total fue determinado por absorción atómica (UNICAM 929 atomic absorption spectrometer), previa digestión ácida de 1 ml de cada fracción en las cuales se añadieron 75 ml HCl cc y 25 ml de HNO<sub>3</sub>cc, llevado a sequedad y enrasado a 25 ml con HCl 1 M. Para determinar el contenido de Fe total del material sin fraccionar, se trató de la misma manera, una alícuota de 10 ml del extracto orgánico total procedente de la primera

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

extracción.

##### *1.1.3.2. Fraccionamiento del extracto húmico total*

Un esquema del fraccionamiento del Extracto Húmico, total ha sido descrito y puede verse en la figura 15.

##### *A) Elución con agua*

En todos estos ensayos de fraccionamiento el Sephadex se preparó con agua de Millipore y los volúmenes de exclusión fueron calculados con Dextrano azul (Pharmacia Fine Chemicals), siendo el eluyente utilizado, en todos los casos, agua Millipore. El material orgánico de partida estaba liofilizado y se añadieron 10 mg de éste previamente disuelto en 5 ml de agua Millipore.

##### *Sephadex G-25*

Se preparó una columna en Sephadex G-25 capaz de separar moléculas con pesos moleculares comprendidos en un rango de 100-5.000 daltons. La columna presentaba un volumen de exclusión de 40 ml (2,5 x 30 cm de Sephadex). Se disolvieron 10 mg del extracto húmico total en 5 ml de agua que se eluyeron por la columna. Se tomaron 18 fracciones de 5 ml cada una. Sólo se recogieron las bandas coloreadas. De cada fracción se tomó una alícuota de 1 ml, que se digirieron con HCl conc. y HNO<sub>3</sub> conc. y se enrasaron en 25 ml de HCl 1M, para determinar por espectrofotometría de absorción atómica (Unicam 929 atomic absorption spectrometer) el Fe total de cada fracción.

##### *Sephadex G-75*

Se procedió como en el caso del Sephadex G-25, presentando la columna las mismas dimensiones. El volumen de exclusión de la columna era de 40 ml. Se tomaron un total de 28 fracciones de 5 ml cada una. El Fe total se determinó de la misma manera que en el caso del fraccionamiento con Sephadex G-25. Se observaron dos bandas, la primera

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

marrón (fracción 8-10) y la segunda amarilla (fracción 11-18).

##### *Sephadex G-200*

Se preparó una columna de Sephadex G-200, que separa moléculas con un peso molecular comprendido entre 5.000-200.000 daltons, de las mismas dimensiones que las utilizadas para los fraccionamientos con Sephadex G-75 y G-25. En este caso se dejó una noche antes de ser utilizada para que el Sephadex G-200 se asentara bien. Se disolvieron 10 mg del extracto húmico total en 5 ml de agua y se eluyeron por una columna que presentaba un volumen de exclusión de 40 ml. Se tomaron 29 fracciones de 5 ml cada una. Se observaron otras dos bandas: una marrón que corresponde a las fracciones 8-10, y la segunda amarilla, desde la fracción 11 a la fracción 23. El Fe total se midió en la forma que se ha indicado en los dos fraccionamientos previos.

##### *B) Elución con NaOH 0,1 M*

##### *Sephadex G-25*

Se tomaron 10 mg del extracto húmico total y se eluyeron en 5 ml de NaOH 0,1M por una columna de Sephadex G-25, preparada con NaOH 0,1M. El volumen de exclusión de la columna era 35 ml. El sólido no se solubilizó completamente en NaOH, motivo por el cual se dejó decantar y la solución clara se separó del líquido. Solamente esta solución se eluyó en la columna. El precipitado se solubilizó en 25 mL de NaOH 0,1M, midiéndose en esta solución el Fe total por A.A, previamente acidificado con HCl 1:1.

Se observó una banda amarilla de la fracción 11 a la 17. En la parte de arriba de la columna existía una banda marrón que no era soluble ni en agua, ni en metanol, ni en HCl 0,1M. Tampoco se consiguió desplazar añadiendo 8 ml de hexano y utilizando de nuevo metanol como fase móvil. Directamente en cada una de las fracciones, se midió Fe total por A.A. y también se realizaron espectros UV y visible.

#### IV. Interacción Fe-materia orgánica

##### *Sephadex G-75*

Se eluyeron 10 mg del extracto húmico total por una columna de Sephadex G-75, preparada con NaOH 0,1M y con un volumen de elución de 40 ml. Ocurrió lo mismo que en el caso anterior, y en consecuencia sólo se tomó la solución clara, completamente soluble en NaOH.

Apareció una banda sencilla de color amarillo, idéntica al caso anterior, que comprendía las fracciones 16 hasta la 24. En la parte superior de la columna existía una banda marrón. Ésta intentó mover, añadiendo dos fracciones de 4 ml cada una de hexano, pero no se consiguió. Se añadieron por este orden tres fracciones que contenían 4 ml de agua, HCl 0,1 N y metanol, respectivamente. Con el último disolvente se consiguió mover la banda marrón, que rápidamente se volvió rosa claro, para aparecer incolora a medida que se iba eluyendo por la columna. A partir de ese momento se utilizó como fase móvil el metanol, que produjo modificaciones en la columna ya que disminuyó su tamaño, pero se recogieron fracciones suficientes para asegurarnos que la banda oscura era totalmente recogida. En total, se tomaron 57 fracciones de 4 ml cada una. Directamente en cada una de ellas, se midió Fe total por A.A., también se realizaron espectros de absorción molecular en el rango 200-700 nm. Los resultados se denominaron NaOH G-75. Las fracciones se lavaron mediante membranas de diálisis, hasta pH 7,0 y se realizaron sus espectros de FTIR.

##### **1.1.4. Fraccionamiento del extracto de agua procedente de la diálisis.**

Todo el sólido procedente del liofilizado se disolvió en 5 ml de agua, de los cuales 3 ml se reservaron para medir Fe total en A.A. Los otros 2 ml se eluyeron por una columna Sephadex G-15 (1x16cm, Volumen de exclusión=6,0 ml). Sólo las fracciones 4 y 5 presentaban color (amarillo). Ambas se juntaron y liofilizaron, disolviéndose el liofilizado resultante en 2 ml de agua Millipore para ser eluido por una columna Sephadex G-25 (V de exclusión de 10 ml) y se recogieron un total de 32 fracciones de 2ml cada una, no coloreadas. Se midió el Fe total en cada una de ellas y se liofilizaron durante una noche para realizar el espectro FTIR, sin que se encuentre precipitado alguno.

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

##### **1.1.5. Aplicación de los ensayos de fraccionamiento en la especiación de Fe en el Extracto húmico total.**

Los complejos orgánicos como las sustancias húmicas pueden afectar a la solubilidad y a la especiación del hierro, factores que inciden directamente en la disponibilidad de este micronutriente para la planta. En general, el Fe(III) forma complejos más estables que el Fe(II), debido a que es un ácido de Lewis más fuerte, por lo que los complejos férricos presentan más posibilidades de aprovechamiento en la agricultura.

El objetivo de este estudio es la especiación del Fe procedente del extracto húmico total del Aquamato férrico, aplicando la cromatografía de permeación sobre gel para separar las especies de Fe(III) disueltas de las coloidales (Giblin y col, 1986). La separación de los compuestos se realiza en función de su peso molecular y son obtenidos por fraccionamiento en columna con Sephadex. Se puede describir el perfil de acomplejación del Fe en función de su tamaño, gracias a que las especies de Fe(II) y Fe(III) pueden formar complejos con diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos que presentan distintos pesos moleculares. Los compuestos orgánicos de Fe(III) son generalmente de elevado peso molecular, muy resistentes a la hidrólisis y a la precipitación mineral (Jones y col, 1993). Una vez separadas, se analizan las fracciones para determinar la concentración de metal por métodos espectroscópicos tal y como se ha ido indicando en los apartados anteriores de este capítulo.

De acuerdo con los ensayos de fraccionamiento descritos en este capítulo, el ensayo de fraccionamiento con Sephadex G-25 eluido con agua fue el que mejores resultados dió. El extracto húmico total presentaba un peso molecular comprendido entre 100 y 5,000 Daltons, y se fraccionaba en dos bandas, sin presentar problemas de interacción con el gel. Los complejos fulvato-férricos se eluían en la banda de mayor peso molecular, mientras que a continuación lo hacían los fulvatos correspondientes a un menor peso molecular.

Tanto el agua utilizada para el eluyente, como la empleada para empacar el gel fue previamente purgada con N<sub>2</sub>. Dado que se había consumido todo el extracto húmico total liofilizado en los ensayos de caracterización, fue necesaria una segunda liofilización de otra

#### **IV Interacción Fe-materia orgánica**

alícuota de 400 ml del extracto húmico total. Se tomaron 10 mg del material húmico y se eluyeron en 5 ml de agua por una columna de Sephadex G-25, también purgada con  $N_2$  para minimizar el efecto del  $O_2$  presente. Aparecieron dos bandas, la primera de color amarillo, y la segunda marrón. Mientras que la banda amarilla era soluble en agua, la banda marrón permanecía inmóvil en el extremo superior de la columna. Cuando la banda amarilla se recogió, (fracciones 7-12), se cambió la fase móvil a NaOH 0,1 M, y de esta forma se consiguió recoger la banda marrón en la fracción 23. En total, se recogieron 35 fracciones de 5 ml cada una. En cada una de las cuales se midió Fe total por absorción atómica, según se ha descrito en el apartado 1.1.3.

El Fe (II) fue analizado aplicando el método de la ferrozina (Stookey, 1970) al fraccionamiento con Sephadex (Luther y col., 1996). La ferrozina acompleja al Fe(II) en solución y produce un complejo púrpura, con un máximo de absorbancia a 562 nm. La curva de calibrado fue realizada con patrones de Sulfato ferroso amónico preparados en agua acidificada y desoxigenada. La solución de ferrozina usada consistía en 0,5 g de ferrozina por 100 mL de agua.

Para cada fracción eluida de la columna se determinó la concentración de Fe total en 6 ml de tampón de acetato sódico 0,01 M (pH=5,3), en el cual se adicionaron 0,5 ml de cada una de las fracciones y 1 ml de cloruro de hidroxilamina ( $NH_2OH-HCl$ ); esta solución reaccionó durante una hora a pH 5 y entonces se le añadieron 0,5 mL de la solución de ferrozina.

El Fe(II) fue determinado de la misma manera pero sin adición de cloruro de hidroxilamina. Las medidas de absorbancia fueron realizadas por duplicado en una celda de 1 cm de absorbancia y se observó que no variaban con el tiempo.

### **1.2. Extracto acuoso**

#### **1.2.1. Extracción acuosa**

Para caracterizar los complejos de Fe procedentes del Aquamato férrico en solución

acuosa, se realizó la extracción del compuesto en este medio, de acuerdo con el esquema mostrado en la figura 17. Para ello se adicionó el humato en agua Millipore con una relación 1:10 (200 g de humato en 2 L de agua). La solución fue agitada magnéticamente durante 30 minutos, decantándose el sólido para ser posteriormente centrifugado durante 30 minutos a 3000 rpm. La disolución resultante presentaba una ligera coloración de tono amarillo pálido. Se liofilizaron 400 ml obteniéndose un sólido amarillo que se denominó *Extracto acuoso*.

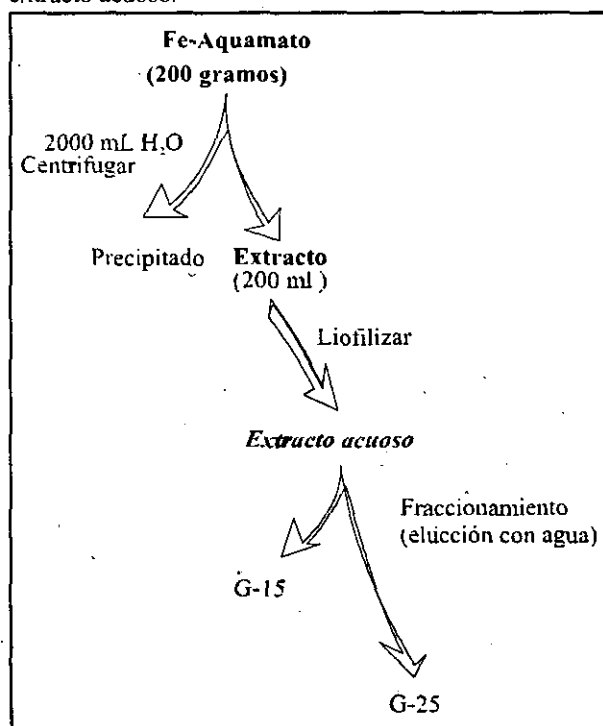
### 1.2.2. Caracterización del extracto acuoso sin fraccionar.

Igual que se hizo con el extracto húmico total, se analizó el extracto acuoso previamente al fraccionamiento. Se preparó una madre añadiendo 10 mg del sólido liofilizado y se disolvieron en 5 ml de agua. A 1 ml de esta disolución se le añadieron 10 ml de HCl 1:1 y se midió directamente Fe total por Espectrofotometría de absorción atómica.

También se realizaron espectros FTIR, UV-visible y análisis elemental de C, H, N y S, como ya se ha indicado en el

apartado 1.1.2 de este capítulo, correspondiente al estudio de caracterización del extracto húmico sin fraccionar.

**Figura 17:** Esquema de la extracción y fraccionamiento del extracto acuoso.



### 1.2.3. Fraccionamiento del extracto acuoso.

#### a) Sephadex G-15

Se escogió el Sephadex G15, capaz de fraccionar en un rango inferior a 1500 Daltons. Se tomaron 10 mg del sólido procedente de la extracción con agua, y se disolvieron en 5 ml de agua.



#### **IV Interacción Fe-materia orgánica**

Se tomaron 2 ml y se eluyeron con agua por una columna (1x16cm) en un volumen de exclusión de 6 ml. Se tomaron 15 fracciones de 2 mL cada una, en las cuales se midió directamente Fe total. Los resultados se denominan G15 extracto acuoso.

Los 3 ml de disolución restantes se utilizaron para conocer el comportamiento del extracto acuoso en el UV/VISIBLE.

##### ***b) Sephadex G-25***

Otros 10 mg del sólido liofilizado procedente de la extracción con agua se solubilizaron en 5 ml de agua y eluyeron en una columna Sephadex G-25 (2,5x35 cm) con un volumen de exclusión de 35 ml. Todas las fracciones fueron incoloras. Finalmente, se midió el Fe total por A.A. en cada fracción.

## **2. RESULTADOS.**

### **2.1. Extracción alcalina**

#### **2.1.1. Caracterización del extracto húmico total sin fraccionar.**

El extracto húmico total se caracterizó de acuerdo con la metodología descrita en el apartado de materiales y métodos, en función de sus propiedades espectroscópicas; en concreto, absorción en el uv-visible e infrarojo, y su contenido en C, H, N, O, S y Fe.

Tanto los espectros de absorción como la espectroscopía de infrarojo, son métodos basados en la radiación electromagnética y han sido tradicionalmente utilizados para caracterizar sustancias húmicas, dado que presentan una serie de ventajas frente a otras técnicas analíticas. Entre estas destacan el hecho de que son técnicas no destructivas, fáciles de manejar y que requieren poca cantidad de muestra (Stevenson, 1994). La caracterización se realiza en base a sus grupos funcionales, aunque el término funcionalidad no debe ser entendido como un grupo funcional simple, sino que debe comprender características más

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

amplias, tales como la naturaleza aromática o alifática, la presencia de insaturaciones o la presencia de pares quinona/hidroquinona. Estas características determinan que la estructura detallada de las sustancias húmicas no puede determinarse con estas técnicas (MacCarthy y Rice, 1985).

El análisis elemental, del carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno e hidrógeno, y las relaciones entre elementos C/H, C/O y C/N son fundamentales para describir y entender la geoquímica de las sustancias húmicas, y probablemente es el indicador más útil sobre su naturaleza, así como del grado de pureza de las mismas (Huffman y Stuber, 1985).

Los resultados obtenidos para el análisis elemental del extracto húmico total y del contenido en Fe total se muestran en la tabla 16. El porcentaje del oxígeno ha sido calculado por diferencia a partir de todos los demás elementos.

Tanto el elevado porcentaje de Fe encontrado en el extracto, como su bajo contenido en C, indican que no se trata de una sustancia húmica pura. Steelink (1985) propone para sustancias húmicas procedentes de suelos valores C comprendidos entre 53,8-58,7 % para ácidos húmicos y de 40,7-50,6% para ácidos fúlvicos, ambos muy superiores a los obtenidos en nuestro análisis.

Valores similares a los de Steelink fueron propuestos por Steinberg y Muenster (1985) para sustancias húmicas acuáticas.

El resto de los elementos se encuentran entre los rangos descritos por los autores, excepto el contenido de O que, sin embargo, sí se aproxima al límite superior para ácidos fúlvicos (39,7-49,8%). El cálculo de oxígeno mediante sustracción directa a partir

del resto de los elementos presenta, según Huffman y Stuber (1985) el inconveniente de

**Tabla 16** Análisis elemental y Fe total para el extracto húmico total.

C (%)	27,35
H (%)	3,36
N (%)	1,28
S (%)	0,67
O (%)	51,94
Fe (%)	16,40
C/H (mol/mol)	0,68
C/O (mol/mol)	0,70
C/N (mol/mol)	24,92

(\*) Oxígeno calculado por diferencia

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

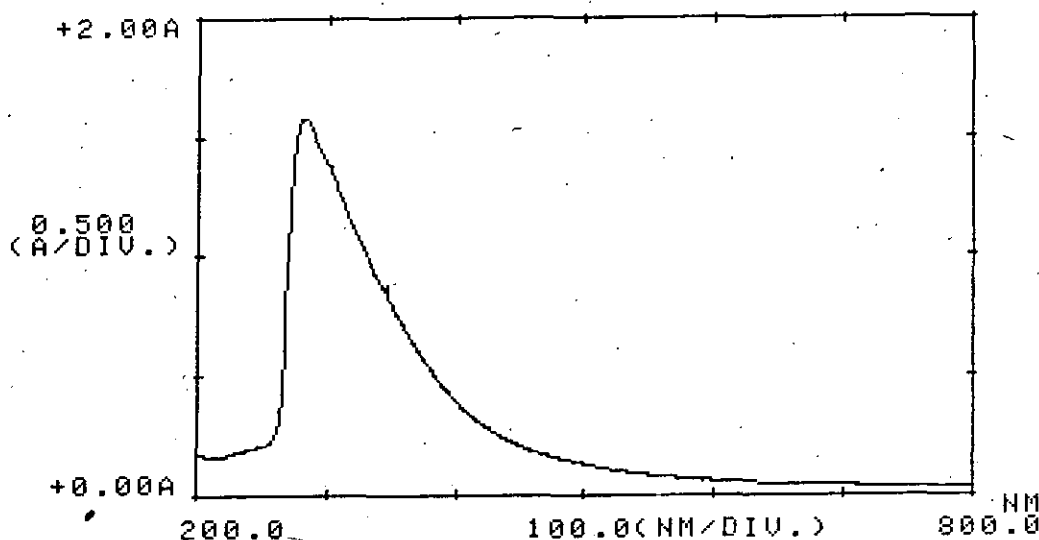
incluir en este valor la suma de los errores que se han podido realizar en todas las demás determinaciones, además de no tener en cuenta otros posibles elementos como Ca, Mg y P que también se pueden presentar en una proporción importante. Estos factores deben ser considerados en la interpretación del contenido de oxígeno.

El porcentaje de C, que fue menor de lo esperado en principio dada la naturaleza acuática del residuo, influye en que las relaciones C/H, y C/O sean también distintas a las de referencia. Independiente de su origen acuático o terrestre, los ácidos húmicos presentan relaciones C/O alrededor de 2; mientras que en los ácidos fúlvicos procedentes de suelos esta relación se aproxima a 1,43 y aumenta a 1,67 para los existentes en medio acuático (Thurman y Malcon, 1983). La relación C/H se acerca a 1,0 para la mayoría de los humatos y fulvatos, tanto en suelo como en aguas (Steelink, 1985). Una relación C/H elevada implica densidad de alto spin, una baja relación  $E_4/E_6$ , un grado elevado de humificación y un contenido fenólico elevado. En el caso que actualmente nos ocupa, el alto contenido en oxígeno, denota una oxidación importante, así como la formación de enlaces entre este elemento y los iones Fe.

Se realizó además el espectro UV/Visible para 10 mg de este material en 25 ml de NaOH 0,1M. Considerando el porcentaje de C determinado en el análisis elemental, la concentración de este elemento en la disolución de medida se aproxima a 110 mg de C · L<sup>-1</sup>. El espectro viene reflejado en la figura 18. Se puede ver la existencia de un pico muy pronunciado a 282,0. La fuerte absorción en la región UV puede ser debida a los grupos aromáticos contenidos en los ácidos fúlvicos y húmicos. Los datos UV-visible para compuestos aromáticos discretos sustituidos con COOH y OH muestran que no solamente absorben fuertemente en esta región, sino que, en general, la absorbancia se incrementa cuando decrece la longitud de onda a 210-240 nm. La presencia de COOH y OH en distintas posiciones de un anillo aromático altera tanto  $\lambda_{max}$  y  $\epsilon$ . Generalmente, cuanto mayor sea la sustitución, mayor será el valor de  $\lambda_{max}$ . En sustancias húmicas sustituidas heterogéneamente con grupos cromóforos se produce sobreposición de bandas (MacCarthy y Rice, 1985). El resultado neto en el espectro UV-visible de los ácidos fúlvicos es un hombro hacia 280 nm con una absorbancia de 1,58.

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

**Figura 18** Absorción UV-Visible del extracto húmico total en NaOH 0,1M



La presencia de cromóforos no aromáticos puede contribuir a la absorción en el UV de las sustancias húmicas, este es el caso de cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas y dicarbonilos. Son especialmente activas las *p*-benzoquinonas, fuertemente coloreadas de amarillo, que absorben débilmente a longitudes de onda larga en el visible, principalmente a valores superiores de 500 nm.

Otro parámetro clásico utilizado para caracterizar sustancias húmicas es la relación  $E_4/E_6$ , magnitud inversamente proporcional al grado de condensación y peso molecular (Chen y col, 1977). Comúnmente esta relación es menor de 5 para los ácidos húmicos y superior para los ácidos fúlvicos. Al no ser una sustancia húmica pura este valor no puede ser considerado directamente para su identificación. La relación  $E_4/E_6$  obtenida para el extracto húmico total es 3,79 cuando se determina en NaOH 0,1M. Es importante referirse al medio utilizado en la medida, ya que el pH influye en el valor de esta relación. Chen y col, (1977) recomiendan la determinación del  $E_4/E_6$  en 0,05 M de  $\text{NaHCO}_3$ , condiciones de pH 8 y concentración fija de sal. Cuando la medida se realiza en medio alcalino, tanto en ácidos fúlvicos como húmicos, el valor de  $E_4/E_6$  decrece. La influencia del pH sobre la absorción

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

en la región visible y sobre la relación  $E_4/E_6$  es debida a los cambios en la  $\lambda_{\max}$  y a la absorptividad con la ionización de los grupos fenólicos (Bloom y Leenheer, 1989).

Según estos datos, podemos identificar la presencia de grupos *p*-benzoquinonas, con una fuerte absorción en el UV (pico a 281 nm) y coloración amarilla. Estas quinonas pueden ser el resultado de la oxidación cíclica de los grupos fenólicos por la presencia del  $\text{Fe}^{3+}$  (Morrison y Boyd, 1985).

**Tabla 17** Principales bandas de absorción en el IR de las sustancias húmicas

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3410 Fuerte y ancha	tensión de los O-H o de N-H (trazas)
2939	tensión de los grupos alifáticos CH
1583,7 Fuerte	Tensión simétrica de $\text{COO}^-$
1402	Flexión de los OH y tensión de C-O de los grupos fenólicos, de C-H de los grupos $\text{CH}_3$ y $\text{CH}_2$ , tensión antisimétrica de los $\text{COO}^-$
1384,6 Fuerte	Tensión $\text{COO}^-$ y flexión CH y CO
1239 débil	$\text{COOH}$ tensión y deformación OH de los grupos $\text{COOH}$ , C-O tensión de los aril éteres
1044,6 débil	C-O tensión de polisacáridos o sustancias análogas, Si impurezas
604,4 fuerte	Flexión CH aromáticos fuera del plano

La figura 19 recoge el espectro de FTIR para el material solubilizado con la extracción alcalina. En la tabla 17, se detallan las bandas que sirven para caracterizar las sustancias húmicas. La presencia de una banda ancha centrada a 3410 cm<sup>-1</sup> indica existencia de grupos OH procedentes de los grupos fenólicos y alcohólicos, banda que es sustancialmente mayor que la encontrada en muchos ácidos carboxílicos simples (MacCarthy y Rice, 1985). Se acepta que cuando existe una banda ancha a 3300-3400 cm<sup>-1</sup>, los OH se encuentran enlazados con puentes de H (Stevenson, 1994).

La banda a 2900 cm<sup>-1</sup> la exhibe a 2939 cm<sup>-1</sup> y aparece solapada a la banda de 3410 cm<sup>-1</sup>, y poco intensa, probablemente debido a que la banda de 3410 cm<sup>-1</sup> la enmascara o a la excesiva sustitución de los anillos aromáticos.

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

La banda a  $1720\text{ cm}^{-1}$ , característica del grupo  $\text{C}=\text{O}$  de aldeídos y cetonas, desaparece para la reacción con los iones metálicos y aparecen nuevas bandas para el estiramiento, simétrico y asimétrico a  $1600\text{ cm}^{-1}$  y  $1380\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. La banda a  $1600\text{ cm}^{-1}$  proporciona información importante sobre la naturaleza del enlace. Para enlaces iónicos, la absorción ocurre a frecuencias comprendidas entre  $1630\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$ . Cuando es coordinado se produce a valores superiores  $1650\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ .

En nuestro caso se observa una banda ancha con centro en  $1583,7\text{ cm}^{-1}$  que puede indicar la presencia de un enlace iónico con el Fe (Stevenson 1994). La acomplejación se ve corroborada por la aparición simultánea de una banda de  $1384\text{ cm}^{-1}$  fuerte que indica la complejación de Fe. Esto hace suponer que los grupos carbonilos se encuentran enlazados mediante enlace iónico con algún tipo de ión metálico, probablemente Fe. El hecho de que no exista la banda de  $1720\text{ cm}^{-1}$  implica que no existen grupos  $\text{C}=\text{O}$  libres.

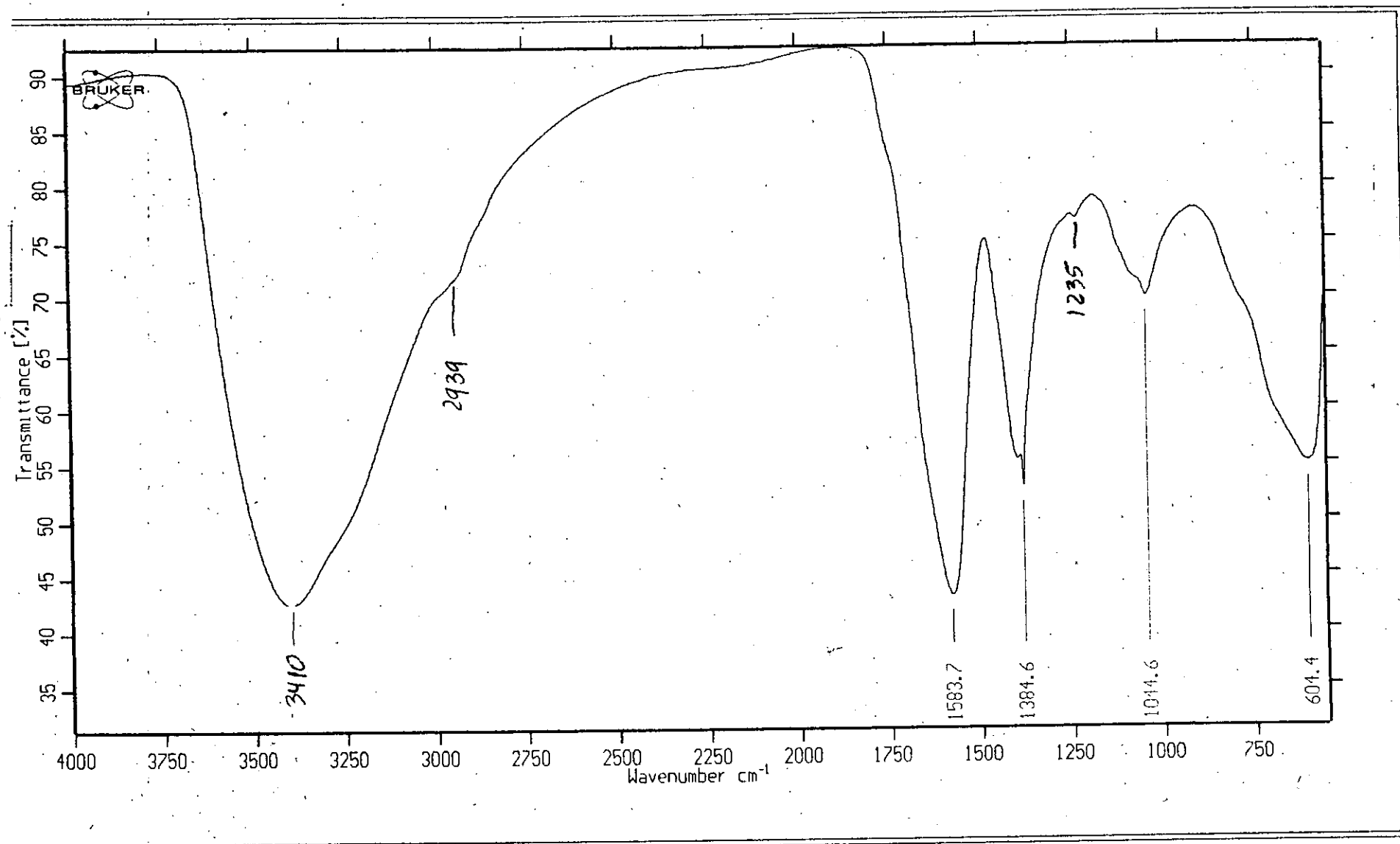
De los resultados obtenidos en la caracterización del extracto húmico total se concluye que se trata de un material que en medio alcalino presenta una fuerte respuesta en el ultravioleta, con un hombro hacia  $280\text{ nm}$  característicos de sustancias de naturaleza fúlvica. Su porcentaje en C es bajo, de acuerdo con los valores descritos para las sustancias húmicas, pero se debe considerar el alto contenido en O y sobre todo en Fe. Este ión se presenta complejo, como demuestran los espectros de FTIR, que también indican el elevado carácter aromático de este extracto húmico total sin fraccionar.

### **2.1.2 Ensayos de fraccionamiento**

#### *2.1.2.1 Fraccionamiento del Extracto húmico (EH) en Sephadex G-75*

Las sucesivas extracciones alcalinas pueden modificar las características de la materia orgánica, por lo que se realizó el fraccionamiento del extracto húmico procedente únicamente de la primera extracción alcalina del Aquamato férrico.

**Figura 19** Espectro FTIR para el Extracto húmico total



#### IV Interacción Fe-materia orgánica

Aunque la separación con Sephadex se basa en la exclusión por el tamaño molecular, se deben considerar las posibles interacciones del soluto en la matriz del gel: (a) el Sephadex tiene alguna capacidad de intercambio catiónico, y las especies aniónicas son excluidas del gel; (b) la parte hidrofóbica se puede adsorber sobre la superficie del gel, especialmente en la parte aromática (Fukushima y col, 1996). La magnitud de estas interacciones queda reflejada en el valor de  $K_{av}$ , definido de acuerdo con la ecuación (4), donde  $V_e$  es el volumen de elución,  $V_o$  y  $V_t$  son los volúmenes de exclusión y total de la columna, respectivamente. Las mencionadas interacciones pueden producirse cuando el soluto supera a la unidad, por lo que es recomendable que éste se eluya a valores inferiores de 1.

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)} \quad (4)$$

En nuestro caso se obtuvieron dos fracciones coloreadas. La primera de color marrón, similar al extracto sin fraccionar, y que comienza a eluirse justo después del límite de exclusión de la columna, lo que indica que su peso molecular es inferior a 50.000 Daltons, y superior a 3.000. La fracción amarilla está próxima al límite de inclusión de la columna pero no lo supera, por lo que su tamaño molecular será próximo a 3.000 Daltons, pero no inferior.

Todas las fracciones mostraron absorción en el visible, como puede verse en la figura 20, donde se muestran las absorbancias a 465 y 665 nm y la relación  $E_4/E_6$  para cada una de las fracciones eluidas de la columna.

Las longitudes de onda 465 y 665 nm han sido tradicionalmente utilizadas para análisis cuantitativo, en condiciones de pH próximas a la neutralidad y cuando las sustancias húmicas utilizadas presentan el mismo origen (Stevenson, 1994). Debido a que las absorbancias a 665 nm suelen ser muy pequeñas, se utiliza fundamentalmente la absorbancia a 465 nm. Es especialmente útil en la monitorización de resultados de los estudios de fraccionamiento. El incremento de la absorbancia puede ser debida a un aumento del peso molecular del compuesto, aumento del porcentaje de Carbono, aumento del grado de

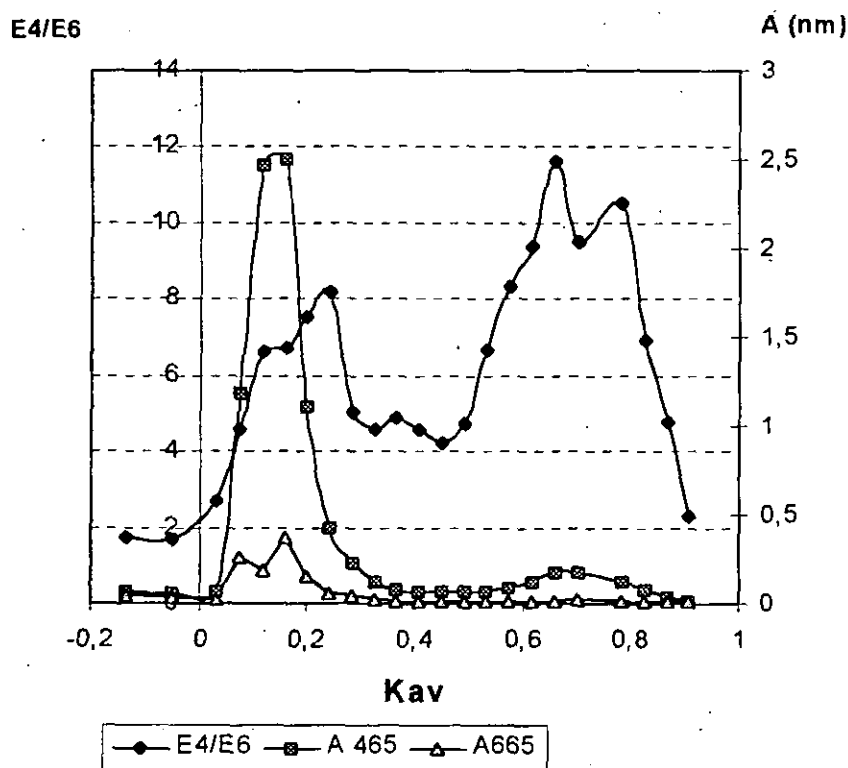


#### IV Interacción Fe-materia orgánica

condensación o aumento de la presencia de carbonos aromáticos frente a estructuras alifáticas.

De acuerdo con los datos de absorbancia a 465 nm, la fracción que presenta mayor peso molecular muestra un pico a  $K_{av}$  0,1, y es la que alcanza mayores valores de absorbancia a 465 nm y mayor porcentaje de C, como demuestra el área del pico. La fracción amarilla lleva asociada menor contenido de C y exhibe un máximo a  $K_{av}$  0,7.

**Figura 20** Relación  $E_4/E_6$  y respuesta a 465 nm y 665 nm de cada una de las fracciones eluidas con agua en el fraccionamiento en Sephadex G-75.

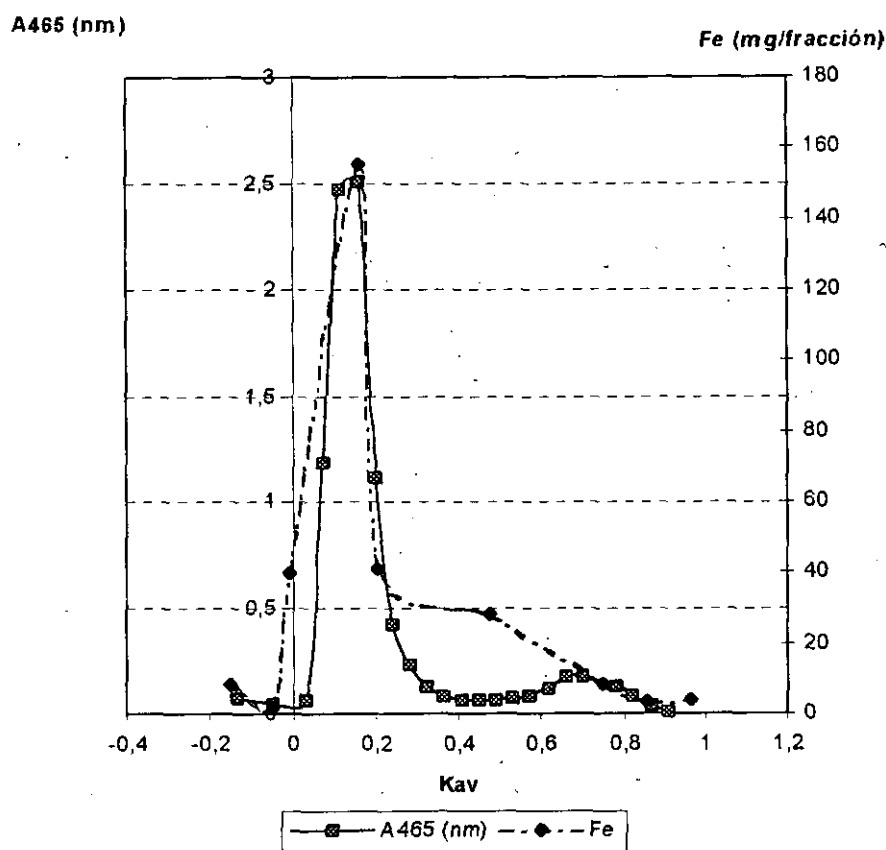


La relación  $E_4/E_6$  también se ha utilizado para la caracterización de sustancias húmicas. En general se espera un valor inferior a 5 cuando se trata de ácidos húmicos y superior a 5 en ácidos fúlvicos. Esta relación decrece cuando se incrementa el peso molecular y la condensación; mientras que se incrementa en relación directa a la presencia

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

de estructuras alifáticas. Las relaciones  $E_4/E_6$  para las distintas fracciones son bastante elevadas. La fracción de mayor peso molecular ( $K_{av}=0,1$ ) alcanza valores entre 6-8, mientras que la fracción amarilla de menor peso molecular ( $K_{av}=0,7$ ) corresponde alrededor de 12. Esto implica que la fracción amarilla es más alifática y con menor grado de condensación. En esta ocasión se aprecia un tercer pico ( $K_{av}=0,35$ ), que podría corresponder a una fracción intermedia de color amarillo más pálido y que alcanza valores de  $E_4/E_5$  de 5.

**Figura 21** Concentración de Fe total y Absorbancia del fraccionamiento del extracto húmico eluido con agua en Sephadex G-75



Para analizar el Fe total asociado en cada una de las fracciones, se realizó un segundo fraccionamiento en las mismas condiciones cromatográficas. En esta ocasión se recogieron las bandas que presentaban el mismo color, en vez de mantener fijo el volumen de 5 ml. Para asegurarnos que el fraccionamiento coincidía con el anterior, se midió la absorción a 465 nm de cada una de ellas. En la figura 21 se describe la absorbancia a esta

longitud de onda y el contenido de Fe total en cada una de las bandas recogidas.

De nuevo se observan las dos fracciones descritas. La mayor parte del hierro total se encuentra asociado a la fracción de mayor peso molecular coincidiendo la concentración máxima de este elemento con el máximo de Absorbancia a 465,0 nm. Pero en la segunda fracción también se refleja una relación Fe/C elevada, lo que indica que existe Fe asociado al carbón orgánico.

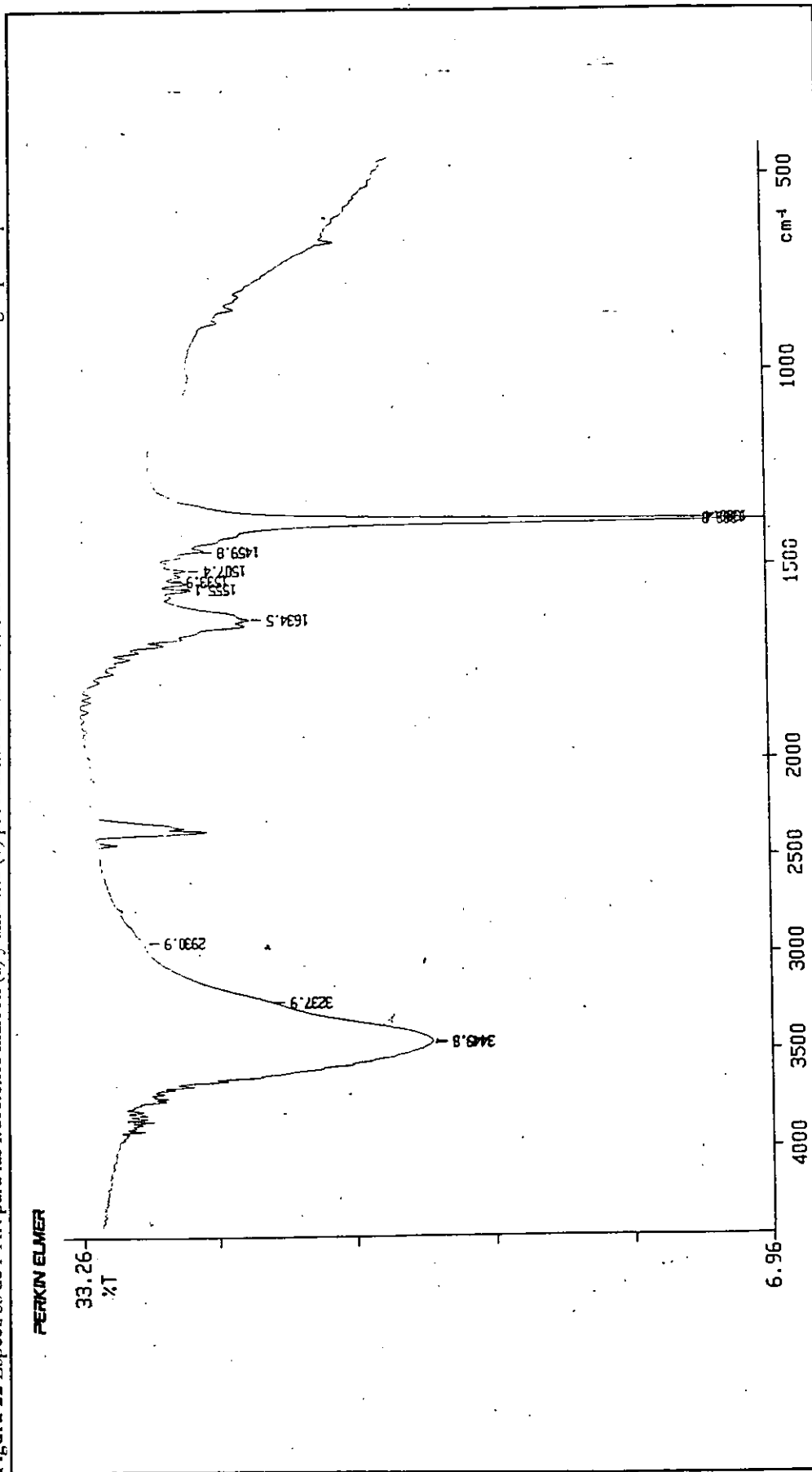
Con relación a la respuesta del fraccionamiento del extracto en la región de infrarrojo, la figura 22 describe los espectros obtenidos para las fracciones de mayor y menor peso molecular y la asignación de las bandas se indica en la tabla 18.

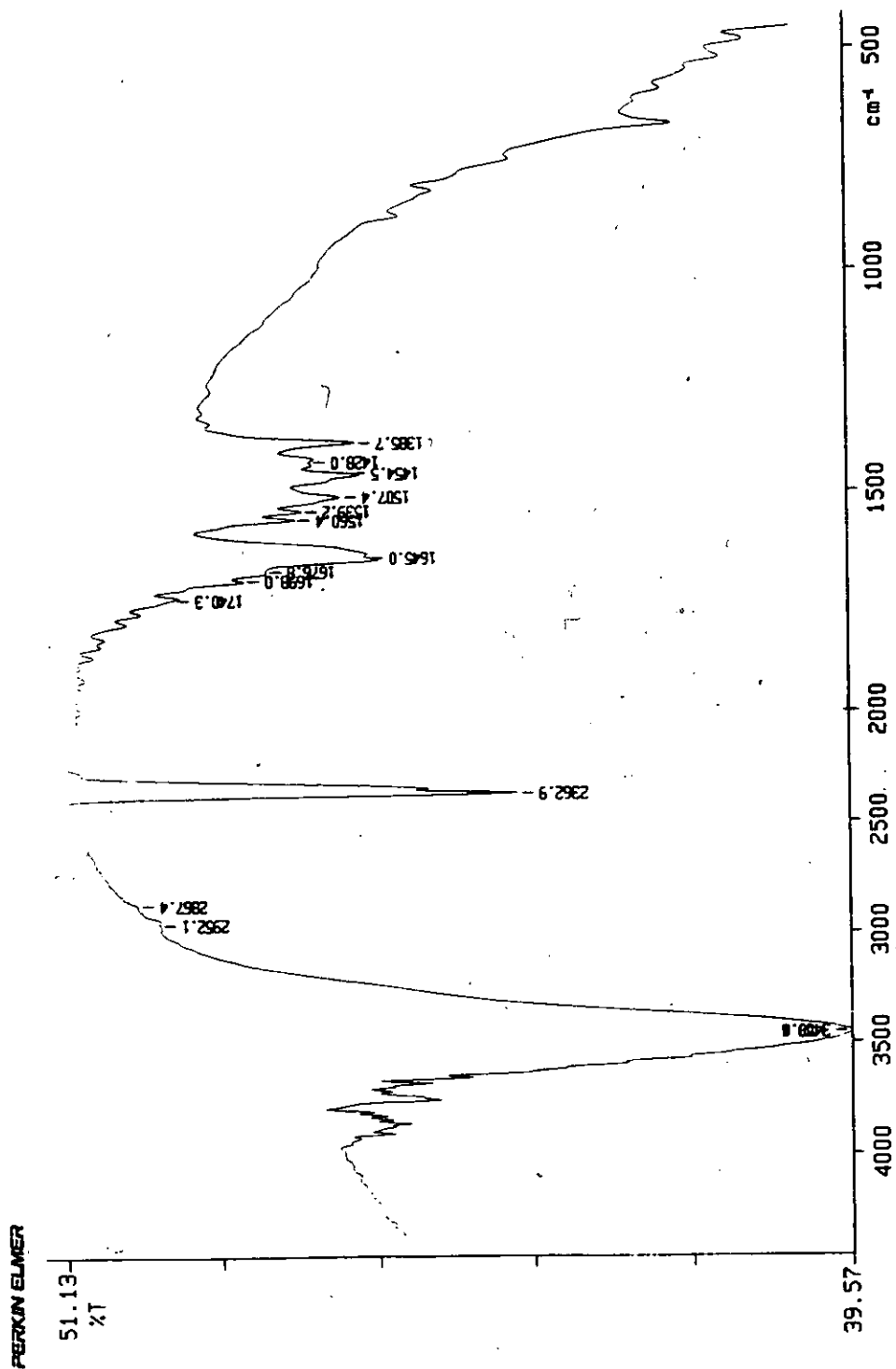
Los espectros FTIR para las dos fracciones presentan características cualitativas similares y son compatibles con un ácido fúlvico de sistemas acuáticos. Ambas exhiben bandas de flexión fuera del plano C-H entre 650-900  $\text{cm}^{-1}$ , que indican carácter aromático, corroborado por el alargamiento C-C en 1500 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  y la flexión C-H en el plano visible en la región de 1000-1100  $\text{cm}^{-1}$ .

Sin embargo, aparecen dos interesantes diferencias. La banda de 3449,8  $\text{cm}^{-1}$ , debida a la tensión de los grupos O-H, intensifica su señal en la fracción de menor peso molecular y lo mismo ocurre en la banda de 1385  $\text{cm}^{-1}$ , asignada a la tensión de los grupos  $\text{COO}^-$  (deformación CH, o tensión C-O de los OH fenólicos).

El incremento de la intensidad de la banda a 3450  $\text{cm}^{-1}$  puede estar asociado al incremento de absorción de OH, imputable a la protonación de los grupos OH y COOH. Estas posiciones pueden estar ocupadas con  $\text{Fe}^{3+}$  en la fracción de mayor peso molecular, por lo que disminuiría su respuesta en el infrarrojo.

Figura 22 Espectros de FTIR para las fracciones marrón (a) y amarilla (b) procedentes de la elución de 10 ml del extracto húmido con agua por Sephadex G-75





96/07/03 14:56 R.S.C. Summer School  
X: 16 scans, 4.0cm-1, apod none, flat, smooth

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

De acuerdo con Boyd y col (1981), el  $\text{Fe}^{3+}$  forma complejos monodentados con los ácidos húmicos del suelo a través del ión carboxilato. Se pueden detectar en el infrarrojo por las bandas de vibración del ión carboxilato que aparecen a 1620 y 1385  $\text{cm}^{-1}$ . Simultáneamente, disminuye la intensidad de la banda de 1700  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo C=O. En nuestro caso la banda de 1700  $\text{cm}^{-1}$  es muy débil en las dos fracciones y aparecen las dos bandas enunciadas: pero, mientras que en la fracción de mayor peso molecular la banda de 1385  $\text{cm}^{-1}$  es débil, en la de menor peso molecular se intensifica, apareciendo muy larga y estrecha. Esto no es congruente con los resultados de Boyd y col (1981), donde las bandas a 1620 y 1385  $\text{cm}^{-1}$  aparecían solapadas.

**Tabla 18** Asignación de las bandas FTIR para la fracción marrón y amarilla obtenidas en los ensayos de fraccionamiento de extracto húmico con Sephadex G-75

Marrón	Amarilla	Asignación
3448,6	3449,8	Tensión de los O-H
2952,1	2930,6	Tensión de los $\text{CH}_3$ y $\text{CH}_2$ de los grupos alifáticos
2867,4		Tensión de los $\text{CH}_3$ y $\text{CH}_2$ de los grupos alifáticos
1740,3	1740,3	Tensión C-O de los grupos $\text{COOH}$ , cetonas y éteres saturados
1698	1689	Tensión C=O de las quinonas
1645	1645,5	Tensión C=O de las quinonas y cetonas conjugadas
1550,4	1550,1	Tensión simétrica de los enoles $\text{COO}^-$
1539,2	1533,9	Vibración de tensión de los C=C aromáticos
1507,4	1507,4	Vibración de tensión del anillo aromático
1454,5	1459,8	C-H alifáticos
1428,0		Vibración de tensión del anillo aromático o vibración del carboxilato
1385,7	1383,9	tensión simétrica del $\text{COO}^-$

Parfitt y col. (1977) estudiaron la adsorción de un ácido fúlvico y un fulvato procedente de un podzol (Glentamar, Aberdeenshire, Escocia) sobre la goethita. En el ácido fúlvico aparecían dos bandas a 1725 y 1215  $\text{cm}^{-1}$  debidas a los grupos  $\text{COOH}$ , mientras que el fulvato de Fe exhibía dos bandas a 1625 y 1400  $\text{cm}^{-1}$  procedentes de la vibración de

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

tensión de los grupos  $\text{COO}^-$ . Cuanto mayor era la concentración de ácido fúlvico evaporado sobre la goethita, las bandas 1610 y 1390 características del fulvato continuaban apareciendo, pero se incrementaba la banda a  $1740\text{ cm}^{-1}$  que indicaba la presencia de los grupos  $\text{COOH}$  más ionizados.

Gu y col. (1994) evaluaron la adsorción de un ácido fúlvico sobre la hematita, y describieron que se efectuaba a través de la complejación del Fe y que el ion carboxilato procedente del ácido fúlvico acomplejaba al Fe de la hematita. Este hecho se confirmó en el infrarojo a través de una banda de  $1640$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$  que indicaba la presencia de iones carboxilato originarios del ácido fúlvico y una segunda banda a  $1400\text{ cm}^{-1}$  que evidenciaba la formación del complejo de Fe.

En los ensayos de fraccionamiento expuestos, prácticamente todo el Fe sale asociado a la fracción de mayor peso molecular y con toda la materia orgánica. La existencia de grupos carboxilo ionizados confirma el enlace entre los grupos  $\text{COOH}$  de la materia orgánica y el Fe, por la existencia de las bandas de tensión del  $\text{COOH}$  centradas a  $1645$  y  $1385\text{ cm}^{-1}$ . Dado que la fracción de menor peso molecular presentaba mucha menor proporción de Fe asociada que la fracción de mayor peso molecular, cabe pensar que la banda de  $1385\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la tensión simétrica del  $\text{COO}^-$ , exhibe estos grupos funcionales libres en disolución, probablemente formando una sal o con otros iones metálicos.

##### *2.1.2 Fraccionamiento del extracto húmico total.*

Toda muestra objeto de análisis debe ser suficientemente representativa del material de partida. En el caso de las sustancias húmicas, las muestras suelen ser muy heterogéneas y están influidas por los métodos de extracción utilizados. Este inconveniente puede solventarse con las extracciones sucesivas y el análisis conjunto en una sola muestra. De esta forma, se consiguen muestras homogéneas que incluyen las características principales de las sustancias húmicas analizadas.

Una vez que se caracterizó el *Extracto húmico* (EH), obtenido de una sola

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

extracción alcalina, se evaluó también el *Extracto húmico total* (EHT), resultado de las cuatro extracciones alcalinas sucesivas.

Para ello se realizó el fraccionamiento del extracto con Sephadex G-25, G-75 y G-200 utilizando como eluyente agua destilada. A continuación se ejecutó un nuevo fraccionamiento del extracto húmico total con Sephadex G-25 y G-75 eluyendo con NaOH 0,1M, a fin de evaluar la influencia del medio alcalino sobre los grupos funcionales y el fraccionamiento.

##### *A) Elución con agua.*

###### *a) Sephadex G-25*

En el ensayo cromatográfico realizado con Sephadex G-25 se utilizó una columna con un volumen de exclusión de 42 ml y en volumen total de 130 ml. Se recogieron 18 fracciones de 5 ml cada una, en las cuales se midió el Fe total por A.A. Como ya se ha mencionado en el apartado de materiales y métodos, solo se analizaron las fracciones coloreadas.

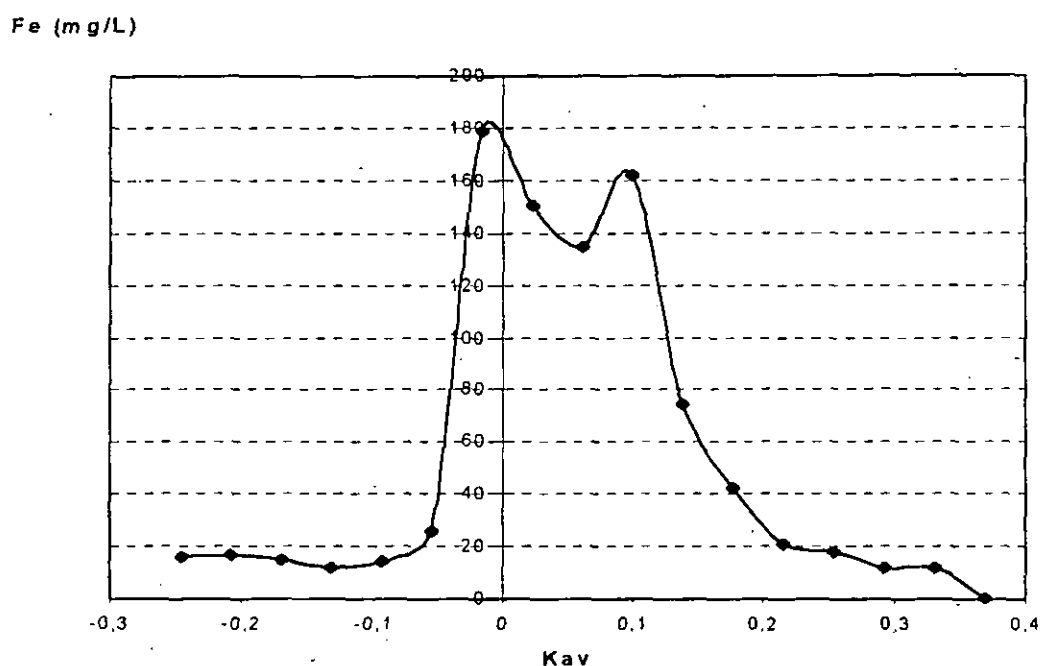
Aparecieron dos bandas coloreadas, una marrón oscura y otra amarilla intensa, estando las bandas solapadas pero bien definidas. La medida de hierro total en las fracciones eluidas con agua en Sephadex G-25 mostraron sin embargo, tres picos como describe la figura 23. La banda marrón oscura presentaba un pico anterior al volumen de exclusión de la columna ( $K_{av} = -0,025$ ), lo que indica un peso molecular superior a 5.000. El segundo pico tiene un volumen de elución inferior al volumen de exclusión ( $K_{av} = 0,1$ ), pero dentro del límite de inclusión de la columna, con un peso molecular comprendido entre 5.000 y 100 Daltons. La banda amarilla intensa ( $K_{av}=0,35$ ) no presentaba asociaciones importantes con el Fe, como puede verse en la figura 23, y su peso molecular se encuentra también entre 5.000 y 100 Daltons. Quizás se deberían haber cogido más fracciones, por lo menos hasta un valor de  $K_{av}$  de 1, ya que se pueden haber dejado fracciones no coloreadas de peso molecular inferior a 100 daltons que lleven Fe asociado, pero se procedió de esta manera al no presentar color. Puede observarse que las fracciones marrones, son las que contienen



#### IV Interacción Fe-materia orgánica

una mayor concentración de este elemento, mientras que en las amarillas esta concentración presenta valores similares a los de la línea base, próximos al blanco.

**Figura 23** Concentración de Fe total en cada fracción del Extracto húmico total eluida con agua en Sephadex G-25



En la figura 24 se presentan los espectros de FTIR de las fracciones coloreadas obtenidas en la separación con Sephadex G-25. Estos espectros tuvieron que ser suavizados en un 60%, para lo que se utilizó el manipulador de espectros de Perkin Elmer, ya que no se disponía de un aparato FTIR Biorad. Se observa que al igual que en los espectros obtenidos en las fracciones provenientes del ensayo de fraccionamiento del extracto húmico total en Sephadex G-75, la intensidad de la banda a  $1384\text{ cm}^{-1}$  aumenta en relación inversa al tamaño molecular.

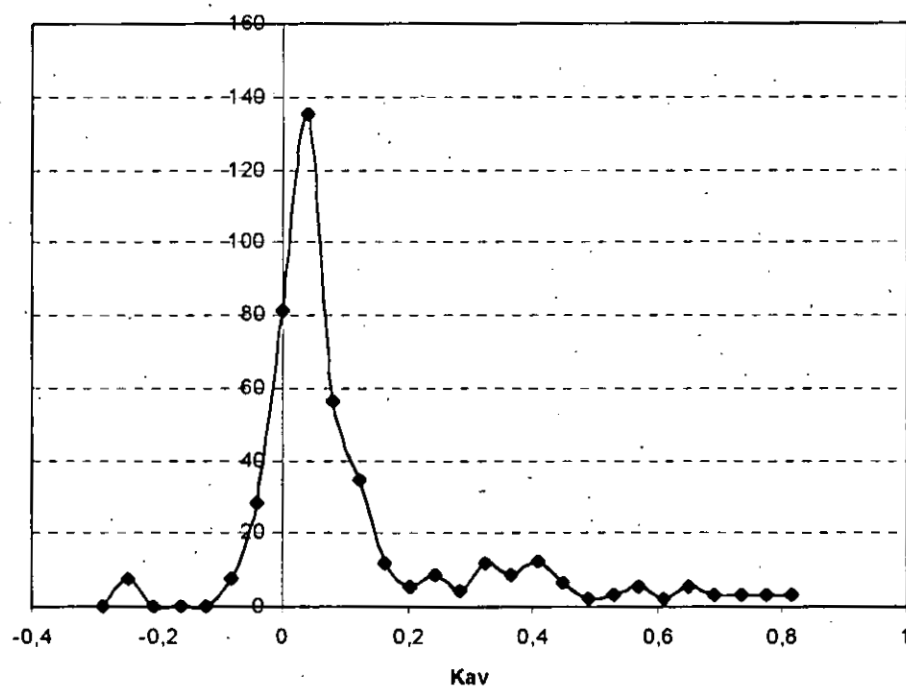
#### IV Interacción Fe-materia orgánica

##### *b) Sephadex G-75*

Las características de la columna utilizada para la separación con Sephadex G-75 incluyen un volumen de exclusión de 40 ml y un volumen total de cama de 123 ml. Se puede observar que los valores obtenidos para el Fe en este ensayo, figura 25 se corresponden con lo encontrado para la muestra correspondiente a la primera extracción (EH) que ya se han comentado. Obteniéndose un primer pico asociado con las fracciones de mayor peso molecular y otro alrededor de  $K_{av}$  0,4 de menor magnitud.

**Figura 25** Concentración de Fe total en cada fracción del extracto húmico total eluida con agua en Sephadex G-75.

Fe (mg/L)

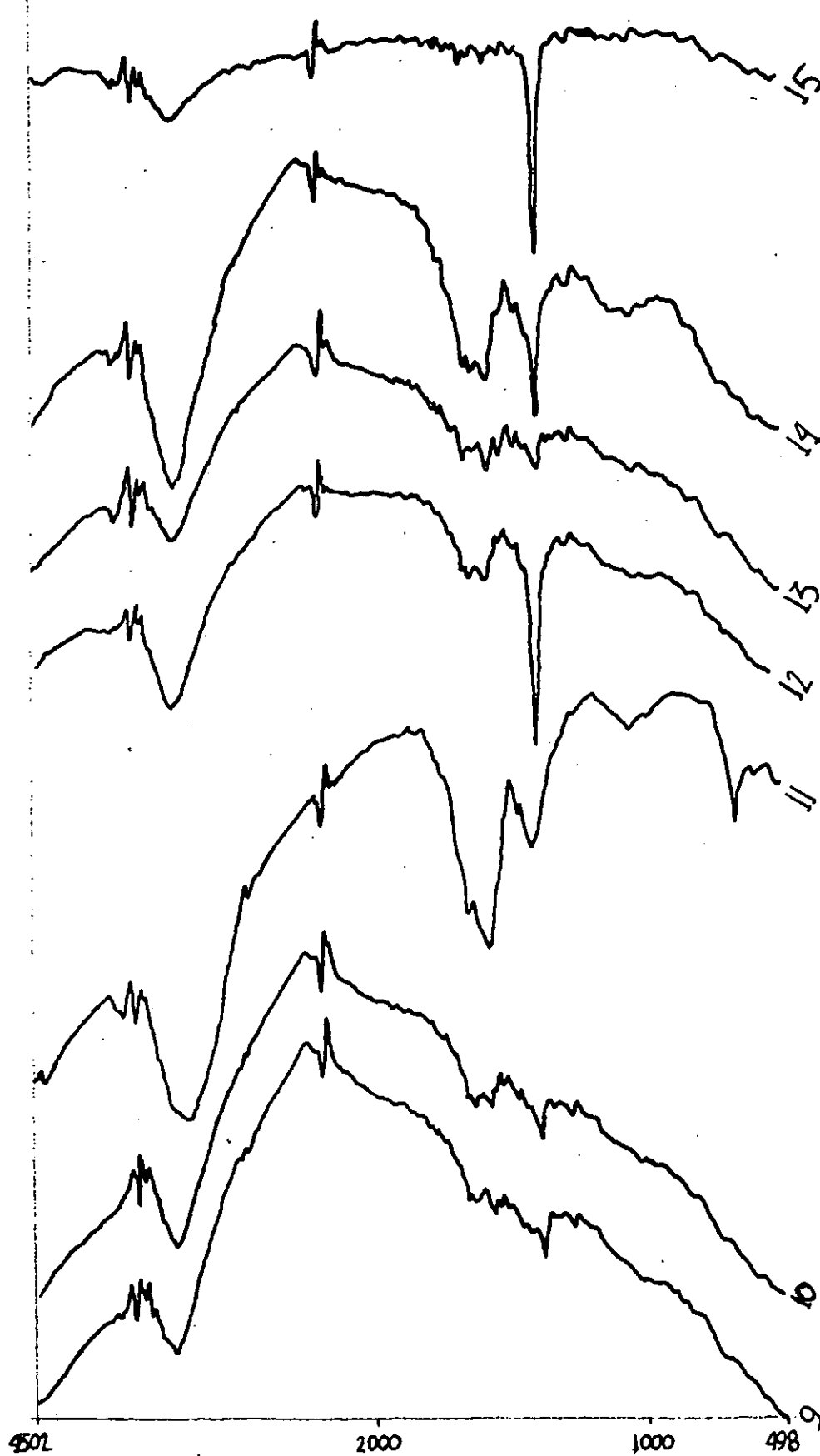


##### *c) Sephadex G-200*

En este caso, la columna utilizada tenía un volumen de exclusión de 40 ml y un volumen total de 120 ml. Se tomaron 28 fracciones de 5 ml cada una, observándose las bandas marrón y amarilla encontradas en los anteriores ensayos de fraccionamiento. Las dos

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

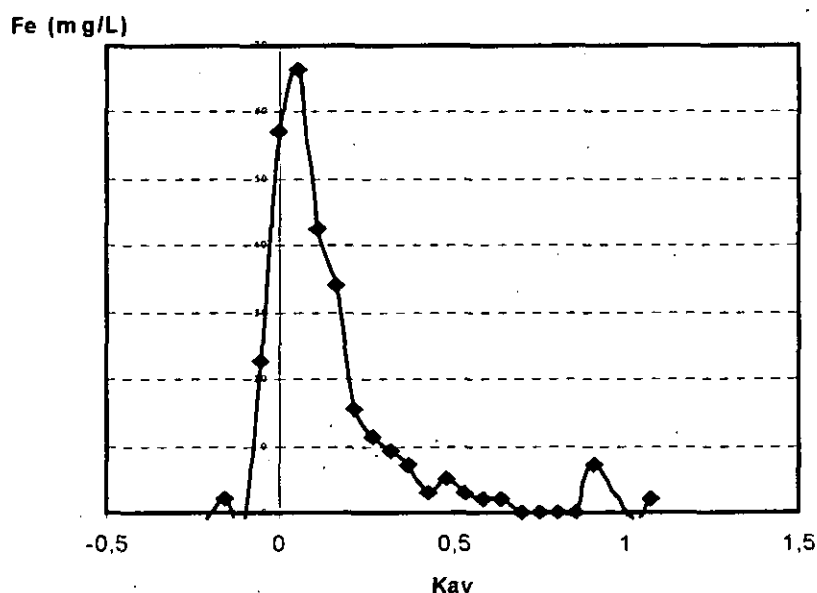
**Figura 24** Espectros FTIR para el fraccionamiento del extracto húmico total con eluidos con agua en Sephadex G-25



#### IV Interacción Fe-materia orgánica

se eluyeron dentro de un volumen superior al límite de inclusión de la columna, lo que indica que sus pesos moleculares están comprendidos entre 200.000 y 1.000 Daltons. La banda marrón correspondiente a los compuestos de mayor peso molecular se recogió totalmente, pero la banda amarilla se iba dispersando en el gel a medida que aumentaba el volumen de elución. Se recogieron todas las fracciones coloreadas.

**Figura 26** Fe total en cada fracción del EHT eluida con agua en Sephadex G-200



La figura 26 muestra el comportamiento del Fe total para cada una de las fracciones recogidas en función del Kav. Aparece otra vez la mayor concentración de Fe asociado en el primer pico, correspondiente a la fracción que presenta un mayor peso molecular que presenta un  $K_{av} = 0,1$ , mientras que en la fracción amarilla contiene menor concentración de este elemento ( $K_{av} = 0,5$ ). Además, se observa un tercer pico amarillo ( $K_{av} = 0,9$ ) más intenso, próximo al límite de inclusión de la columna que sí presenta asociación con el ión metálico, y su peso molecular estaría próximo a 1000 Daltons. No obstante, debe decirse que el Fe recogido en la fracción oscura es menor que en las anteriores, por lo que se puede intuir que el resto del Fe añadido queda retenido en el interior de la columna.

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

##### *B) Elución con NaOH 0,1 M*

###### *a) Sephadex G-25*

El fraccionamiento con NaOH 0,1 M fue problemático, ya que en principio no todo el sólido se disolvió en los 5 mL iniciales de esta solución, por tanto sólo se tomaron 4 mL después de dejar decantar el sólido marrón con aspecto coposo. Este precipitado sí resultó ser soluble en 25 mL de NaOH 0,1M, midiéndose por Absorción Atómica el Fe total presente en el precipitado, previa digestión ácida. Los datos revelan que el precipitado contenía aproximadamente 0,360 mg de Fe, lo que supone un 20% del contenido de Fe en el *Extracto húmico total* (EHT).

Además, se produjeron fenómenos de interacción entre el gel y el material a fraccionar. A pesar de todo, el fraccionamiento del extracto húmico total en estas condiciones presentó las dos bandas que ya habían aparecido en los anteriores ensayos, una banda marrón y otra amarilla. La banda amarilla se eluyó como se esperaba, pero la banda marrón se quedó retenida. Ya se ha indicado en el apartado de materiales y métodos que fue imposible desplazar toda la banda, a pesar de la aplicación con agua, hexano HCl y metanol. Sin embargo, se consiguió fraccionar una parte importante del material. Se debe comentar que, como consecuencia de la utilización de metanol como fase móvil, las características de la columna se modificaron, reduciéndose su tamaño.

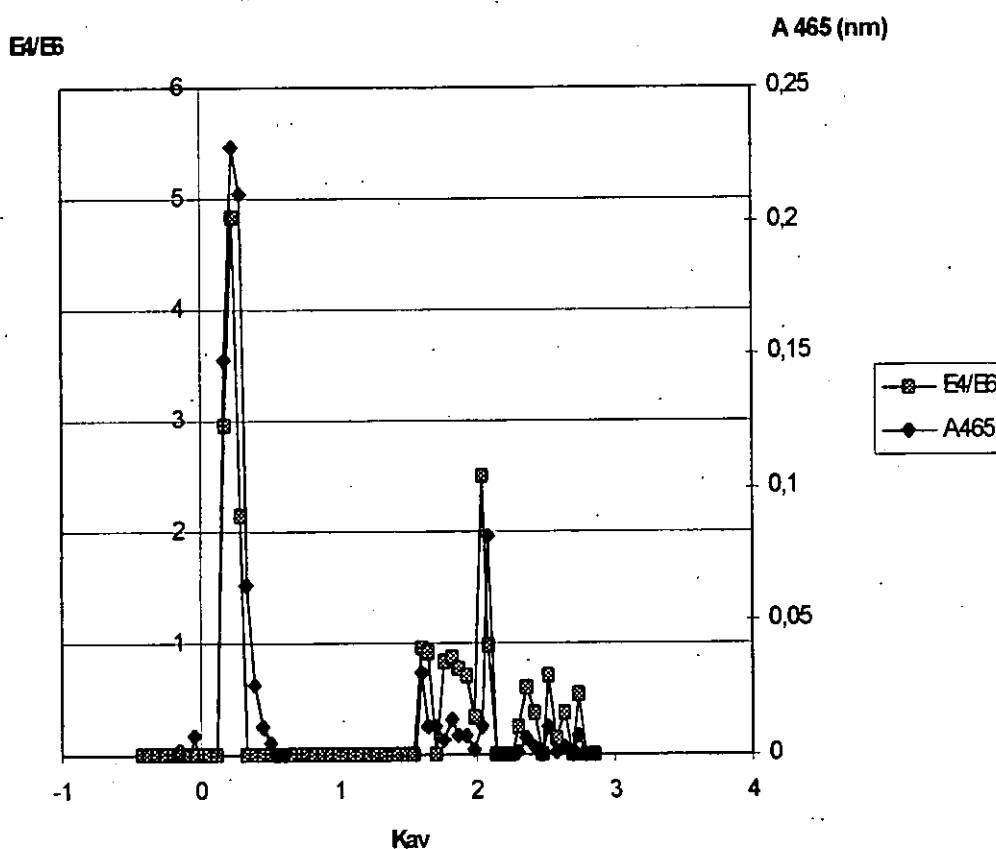
La absorción a 465 nm para cada una de las fracciones del material orgánico soluble en nuestras condiciones, se presenta en la figura 27. En ella se puede observar antes del límite de exclusión de la columna se puede ver un pequeño pico, que absorbe débilmente a las longitudes de onda definidas. Su peso molecular por lo tanto será superior a 5.000 Daltons. Las fracciones coloreadas amarillas se eluyeron con un  $K_{av}$  de 0,23, lo que implica un peso molecular entre 5.000 y 100 Daltons.

Tan sólo la banda amarilla se separó en función de su peso molecular. Los otros dos picos que se ven en la figura 27 fueron adsorbidos por el gel y posteriormente desplazados con metanol; como consecuencia, no se puede evaluar sus pesos moleculares con relación

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

a la fracción amarilla. La primera banda era soluble en NaOH 0,1M, mientras las otras dos se eluyeron con metanol, después de haber añadido HCl y hexano. Estructuralmente, el Sephadex es un dextrano modificado con un elevado contenido en grupos hidroxilos que le confieren un fuerte carácter hidrofílico. La interacción de fenoles con los geles de Sephadex fue demostrado por Brook y Housley (1969), con causa en la formación de puentes de hidrógeno con los grupos hidroxí-éter en las cadenas de dextrano.

**Figura 27** Absorbancia a 465 nm y relación  $E_4/E_6$  en cada fracción del EHT eluida con NaOH 0,1 M en Sephadex G-25

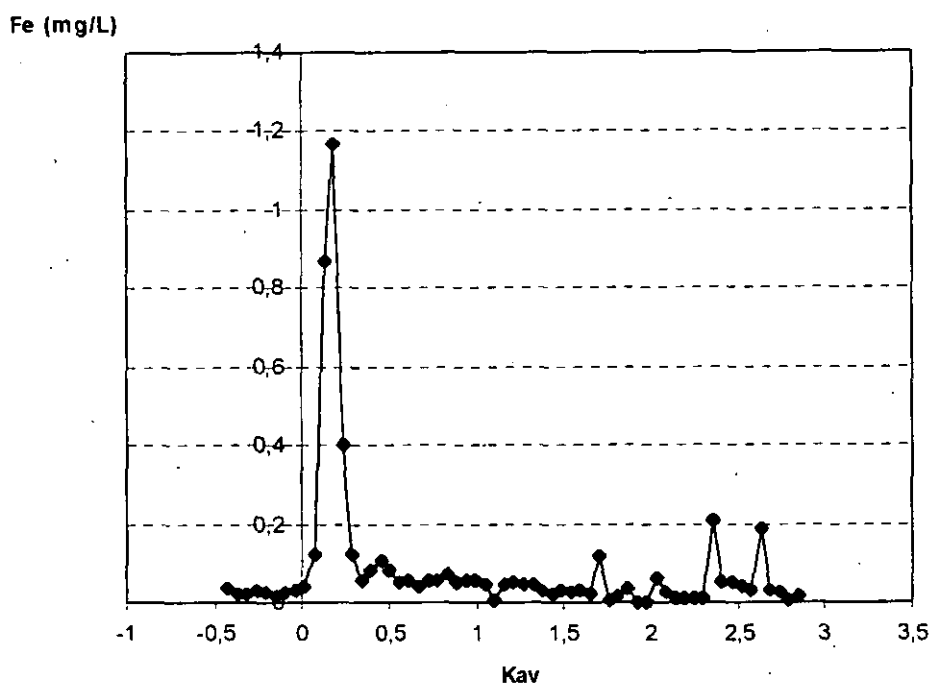


Desde un punto de vista cuantitativo, la absorbancia a 465 nm muestra que el porcentaje de C asociado a las fracciones no es muy elevado. Considerando que sólo se tomó la fracción soluble en 4 ml y que el precipitado restante se disolvió en 25 ml de NaOH 0,1M, parece que no se solubilizó toda la materia orgánica.

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

La relación  $E_4/E_6$  puede también verse en la figura 27. La respuesta es similar a la reflejada por la absorbancia a 465 nm. La fracción amarilla presenta relaciones  $E_4/E_6$  superiores a 5, mientras que en el resto de los picos estos valores no superan 3.

**Figura 28** Concentración de Fe total en cada fracción del EHT eluida con NaOH 0,1 M en Sephadex G-25.



En cuanto a la concentración de Fe total medido por Absorción atómica en cada una de las fracciones obtenidas, en la figura 28 aparece el cromatograma. El patrón de elución es prácticamente idéntico al obtenido en la absorción UV/visible, pero los contenidos totales de Fe son menores a los procedentes de los fraccionamientos del extracto húmico total, utilizando agua como eluyente.

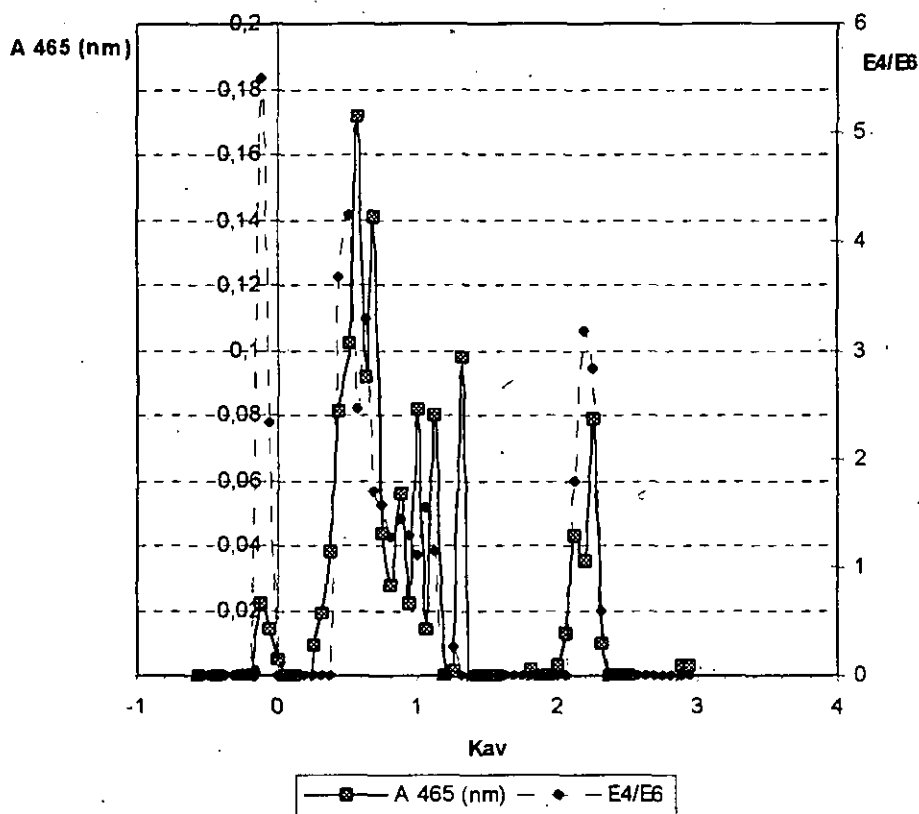
##### *b) Sephadex G-75*

En el fraccionamiento del material orgánico con Sephadex G-75 en NaOH 0,1M también se presentaron los problemas de adsorción, indicados en el apartado anterior, pero

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

en este caso fue posible eluir la banda marrón oscura retenida sobre el gel, gracias al metanol o a su acción conjunta con el hexano, HCl y agua.

**Figura 29** Relación  $E_4/E_6$  para cada una de las fracciones del EHT eluidas con NaOH 0,1M en Sephadex G-75



Las características espectrales en el visible del material fraccionado viene dado en la figura 29. Con relación a la absorbancia obtenida para cada una de las fracciones a una longitud de onda de 465 nm, se puede observar que existen tres fracciones bien definidas. La primera aparece antes del volumen de exclusión de la columna, lo que parece indicar que su peso molecular es superior a 50.000 Daltons. Esta fracción exhibe un señal muy débil. Inmediatamente después del límite de exclusión, se eluye la fracción amarilla que presenta la señal más intensa en las condiciones espectroscópicas de nuestro estudio. Los dos picos de menor intensidad, que aparecen a continuación de la fracción amarilla y después del límite de inclusión de la columna, indican la aparición de nuevos compuestos de peso



#### IV Interacción Fe-materia orgánica

molecular inferior a 1.000 Dalton.

Tal y como se comentó en el fraccionamiento del EHT eluido con NaOH en Sephadex G-25, a partir de este momento ya no se puede comparar los pesos moleculares de las sustancias eluidas, pues la teoría de la exclusión no es aplicable cuando se han producido fenómenos de adsorción entre la matriz del gel y las fracciones.

Después de 88 ml de NaOH, prácticamente cuando se había recogido toda la banda amarilla, se añadieron por este orden dos fracciones de hexano, dos de H<sub>2</sub>O y dos fracciones de HCl 0,1M. En total 24 ml de diferentes fases móviles, ineficaces para desplazar la banda marrón. Hasta este momento, la columna no modificó su tamaño, ni su aspecto. A continuación se añadieron 4 ml de metanol, la banda se volvió rosa y comenzó a desplazarse a gran velocidad por la columna. La coloración rosa puede ser debida a la presencia sales ferrosas que son estabilizadas en solución de polialcoholes, los cuales, además de formar complejos con el Fe<sup>2+</sup> inhiben cineticamente la oxidación atmosférica (Arribas y col, 1975). En ese momento la columna redujo su tamaño como consecuencia del uso del metanol, pero se recogió toda la fracción adsorbida por el gel.

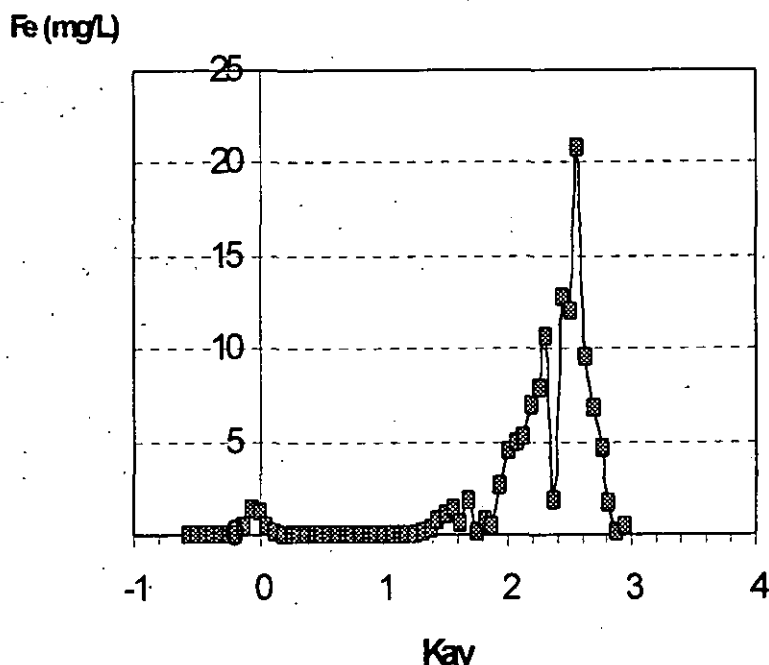
En los anteriores ensayos de fraccionamiento del extracto húmico, habíamos utilizado la medida de la absorbancia a 465 nm en análisis cuantitativo, y la relación  $E_4/E_6$  para determinar los posibles cambios conformacionales que existen entre las fracciones. Esto era posible dado que se había utilizado siempre el mismo eluyente. En esta ocasión no podemos comparar cuantitativamente los resultados de las distintas bandas ya que no se utilizaron los mismos disolventes a lo largo del fraccionamiento (Chen y col, 1977; Hayes, 1985).

Con respecto a la relación  $E_4/E_6$ , aparecen tres bandas recogidas también en la figura 29 aunque sólo son comparables las dos primeras. La primera banda aparece antes del volumen de exclusión de la columna, por lo que su peso molecular será superior a 50.000 Dalton. Su relación  $E_4/E_6$  es mayor que la de la fracción amarilla, que se eluye a continuación con un  $K_{av}$  0,5. Su peso molecular aparente se encuentra dentro de los límites de separación del Sephadex G-75 entre 50.000 y 1.000 Dalton. Chen y col (1977) indicaron

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

que la relación  $E_4/E_6$  decrece cuando se incrementa el tamaño molecular y la condensación. De acuerdo con esta afirmación, dado que la fracción primera presenta mayor peso molecular y también mayor relación  $E_4/E_6$ , se espera que presente un mayor carácter alifático. La figura 29 presenta además una tercera banda a un  $K_{av}=2,3$ , dado que ésta se eluyó con metanol, no es comparable con la otras dos aunque su relación  $E_4/E_6$  es menor.

**Figura 30** Concentración de Fe total en cada fracción del EHT eluida con NaOH en Sephadex G-75



El contenido de Fe total para cada una de las fracciones eluidas viene dado en la figura 30. Una primera asociación Fe-húmico aparece en la banda mayor de 50.000 Dalton. Tal y como se ha ido comprobando a lo largo de este estudio, la banda amarilla, no contiene Fe en ninguna de sus fracciones. La mayor parte del hierro aparece prácticamente al final del cromatograma, en aquellas fracciones que se adsorbieron en la matriz del gel. Curiosamente, sólo una de las fracciones presenta asociación C-Fe, el resto no respondió al estímulo del visible. Debe recalcar, que estos datos no indican que la mayor parte del hierro se encuentre formando compuestos de bajo peso molecular en condiciones alcalinas.

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

De hecho, Bronsted (1931) sugirió que las sustancias de mayor peso molecular en series homólogas mostraban mayor afinidad por la fase estacionaria y como consecuencia se atrasaban respecto de las sustancias de menor peso molecular.

En la figura 31 se representan los espectros FTIR de las fracciones obtenidas que mostraron las diferencias estructurales entre las fracciones obtenidas. La tabla 19 muestra la asignación de las bandas obtenidas, siendo F17 (fracción 17) que presenta un  $K_{av}$  de 0,43; F19 (fracción 19) con  $K_{av}$  0,56 y F21 (fracción 21) con  $K_{av}$  0,69. Estas tres fracciones presentaban coloración amarilla. Los  $K_{av}$  de las otras tres fracciones que aparecen en la tabla, F 36 (fracción 36), F 52 (fracción 52) y F54 (fracción 54), correspondían respectivamente a  $K_{av}$  1,62; 2,69 y 2,75.

Las fracciones 17, 19 y 21 correspondientes a la banda amarilla son compatibles con un fulvato, similar al encontrado en los fraccionamientos con agua. En esta ocasión todos los grupos aparecen desprotonados, como pone de manifiesto la ausencia de la banda a  $1725\text{ cm}^{-1}$ . No se detectó Fe en ninguna de estas fracciones, pero si existe la banda a  $1400\text{ cm}^{-1}$  que confirma el ion carboxilato, por lo que en estas fracciones estarán formando una sal. El resto de las bandas asignadas muestran la presencia de grupos C=O de las cetonas conjugadas, estructuras alifáticas, y también algún anillo aromático.

La fracción 36 se eluyó tras la interacción con el metanol. En esta fracción se encontró Fe, que no parecía tener asociado C orgánico. Así, el espectro no parece compatible con una sustancia húmica. La presencia de bandas intensas entre  $600$  y  $900\text{ cm}^{-1}$  indica la existencia de estructuras aromáticas, en concreto la banda a  $833,7$  refleja anillos p-sustituídos. El contenido alifático disminuye respecto de las fracciones que participaban en la banda amarilla. Las bandas a  $1622$  y  $1384\text{ cm}^{-1}$  indican la formación del complejo de Fe por el ion carboxilato.

Para terminar hay que comentar las fracciones 52 y 54, correspondientes al final del procedimiento, que presentan un menor contenido alifático que las anteriores. Sin embargo, reflejan anillos aromáticos, como denotan las bandas de flexión fuera del plano de C-H que aparecen entre  $650$ - $900\text{ cm}^{-1}$ . Estas fracciones contenían la mayor concentración de Fe

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

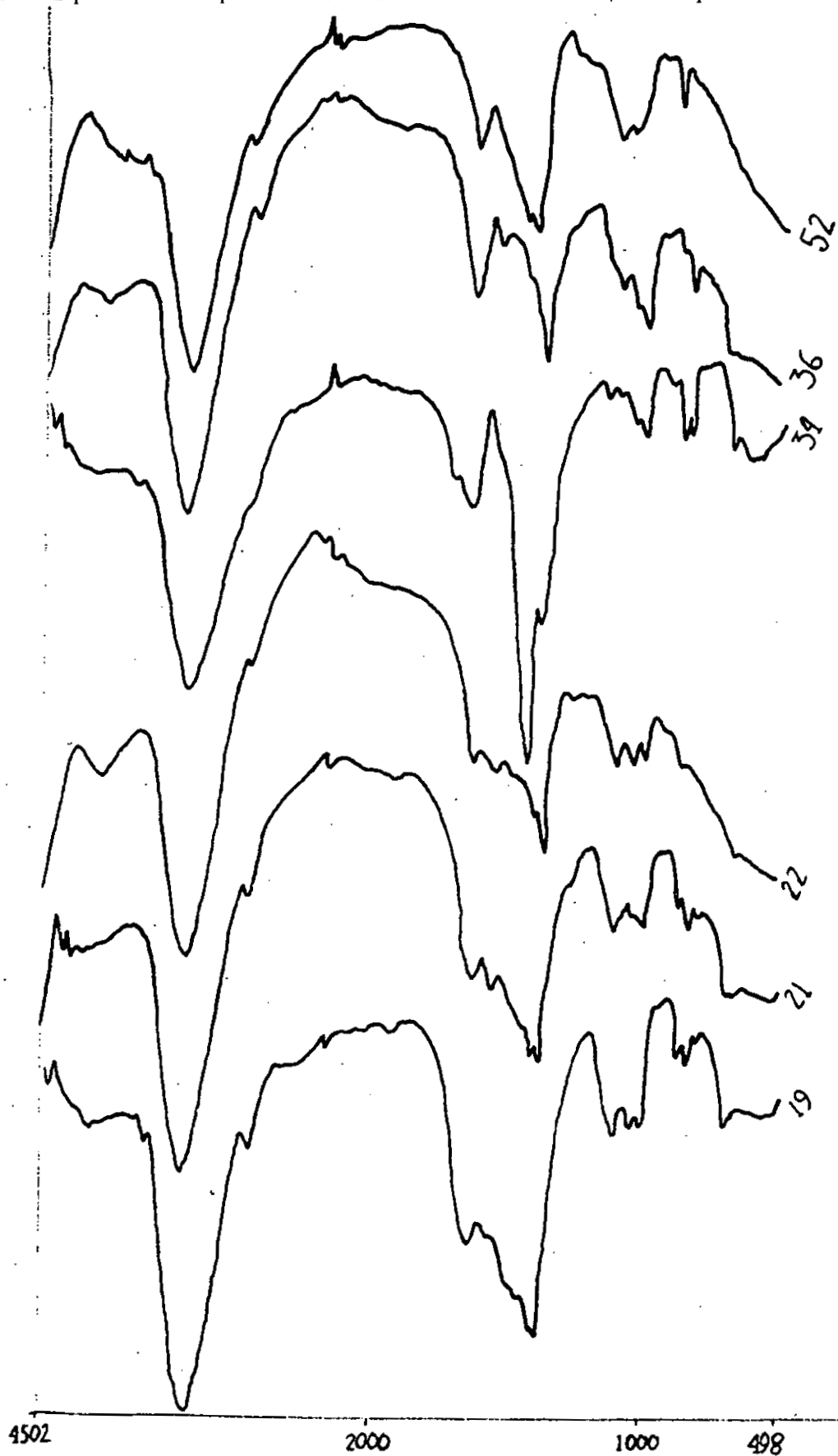
eluido, especialmente la fracción 52. Ambas se diferencian por la intensidad de sus picos a  $1400\text{ cm}^{-1}$ , que en la fracción 54 disminuye respecto a la fracción 52, indicando menor contenido de Fe enlazado. No se aparecen grupos carboxilos protonados.

**Tabla 19** Asignación de las bandas del FTIR a las fracciones 17, 19, 21, 36, 52, 54 eluidas del fraccionamiento del EHT con NaOH 0,1M en Sephadex G-75

F 17	F 19	F 21	F 36	F 52	F 54	Asignación de las bandas
3386	3439	3437	3437	3413	3439	Tensión O-H de los grupos fenólicos
2950		2962		2946		Tensión C-H alifáticos
	2933	2921	2929			Tensión C-H alifáticos
		2864				Tensión C-H alifáticos
1667	1651					Tensión C=O quinonas y/o C=O-H en cetonas conjugadas
		1633	1623	1634	1614	Vibraciones C=C de estructuras aromáticas, tensión COO- simétrico
1556		1556	1554			Tensión COO- simétrico
		1452				C-H deformación del $\text{CH}_3$ y flexión de C-H del $\text{CH}_2$
1386		1384	1384	1385		COO- tensión asimétrico (CH deformación y tensión CO de O-H de los fenoles)
	1362	1339	1362			Tensión simétrico COO-, $\text{CH}_3$
1259	1263	1262	1271			Tensión C-O (CO, COOH, COC) y deformación O-H de los grupos fenólicos
			1148			OH alcohol alifático
1109	1108	1107	1108	1099	1108	Flexión C-H aromático fuera del plano
			1045		1023	Tensión C-O aril y vinil éteres
1001	1000	1000	1014	1002		Flexión COH, tensión CO de alcoholes y éteres,
841	873			874		Flexión C-H aromático fuera del plano
836		828	834			Flexión C-H aromático fuera del plano
702	701	711	705		722	Flexión C-H aromático fuera del plano

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

**Figura 31** Espectros de FTIR para el fraccionamiento de EHT con NaOH 0,1M en Sephadex G-75



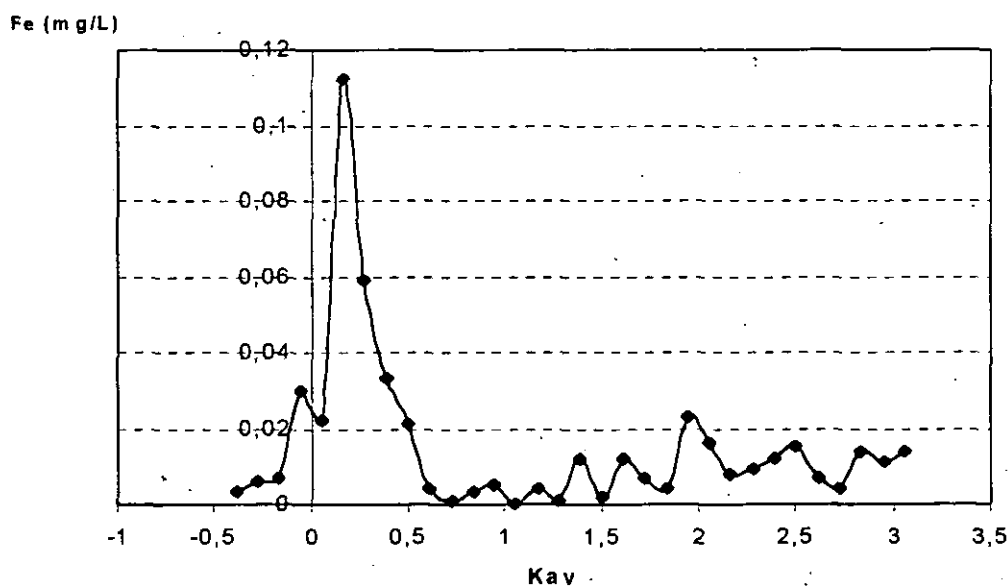
#### IV Interacción Fe-materia orgánica

El espectro de absorción en el UV-visible muestra dos picos que aparecen a 224 y 336 nm. El ácido salicílico presenta tres picos a 204, 236 y 307; mientras que sus sales presentan dos picos. La sal con un protón menos aparece a 230,5 y 296 nm, al tiempo que mientras que totalmente desprotonada lo hace a 242 y 306 nm. Esto induce a pensar que nos encontramos con fenoles sustituidos del tipo ácido salicílico o catecolaminas, formando complejos de Fe.

##### **2.1.3 Fraccionamiento del agua procedente de la diálisis.**

De acuerdo con lo descrito en el apartado de materiales y métodos se liofilizó el agua de la diálisis, obteniéndose muy poco precipitado. Éste se disolvió en 5 ml de agua y se eluyeron 2 ml a través de una columna de Sephadex G-15 (Vexclusión 6,0 ml). Solo dos fracciones presentaban color, la 4 y 5, eluidas a 8 y 10 ml, respectivamente, menor al volumen de exclusión de la columna. Se determinaron sus características espectroscópicas en el uv/visible, mostrando que la absorbancia de la fracción 4 a 465 nm era 0,049 nm y su relación  $E_4/E_6$ , 5,4, valor encontrado para los ácidos fúlvicos procedentes de compost (Boyd y Sommers, 1990).

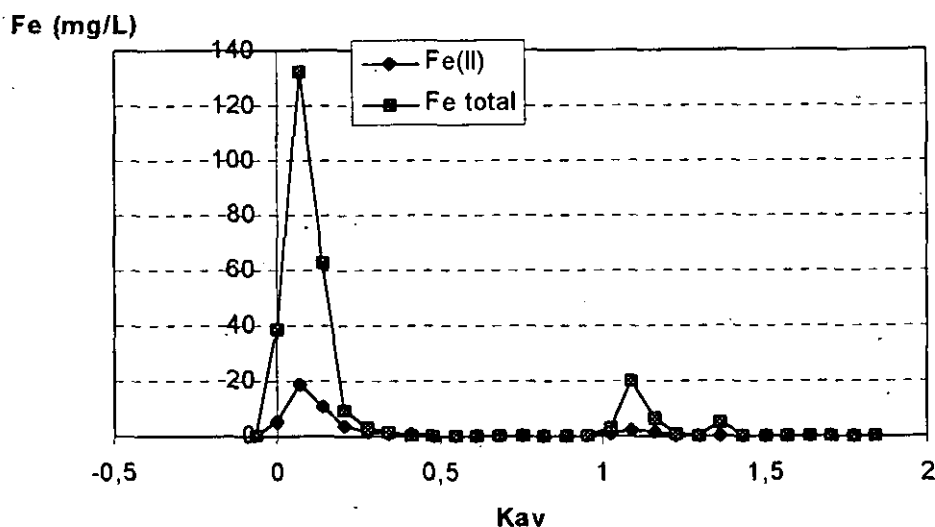
**Figura 32** Fraccionamiento del agua procedente del diálisis en Sephadex G-25



#### IV Interacción Fe-materia orgánica

Las dos fracciones se liofilizaron juntas, y este precipitado se eluyó por una columna Sephadex G-25 y se midió el Fe total contenido en cada una. En este segundo fraccionamiento se recogieron un total de 32 fracciones de 2 ml cada una. Ninguna de las recogidas presentaba color. La figura 32 muestra el Fe total contenido en cada una de las fracciones recogidas. La mayor parte del Fe se recoge después del límite de exclusión de la columna.

**Figura 33** Especiación del Fe en cada una de las fracciones eluidas del EHT con agua en Sephadex G-25.



Estos resultados indican que los complejos de hierro pueden atravesar la membrana de diálisis. Estas pérdidas son mayores cuando las condiciones de trabajo presentan pH superiores a 9,5, por lo que puede tratarse de complejos de naturaleza fúlvica.

##### **2.1.4 Especiación de Fe en el extracto húmico total**

La especiación del Fe se realizó de acuerdo con lo descrito en el apartado 1.1.5 de este mismo capítulo. Lo primero que conviene destacar es que el material de partida, si bien provenía del extracto húmico total obtenido al inicio del ensayo, procedía de una segunda liofilización. Aunque el extracto húmico total líquido se conservó en un bote de propileno herméticamente cerrado y aislado de la luz, y no se observó presencia de precipitado, el material se modificó. Los cambios que se produjeron afectaron especialmente a su

#### **IV Interacción Fe-materia orgánica**

solubilidad que a continuación pasamos a describir.

Se partió de 10 mg del extracto húmico total, que se eluyeron en 5 ml de agua destilada calidad millipore por una columna de Sephadex G-25. Como ya se ha indicado en el apartado 1.1.5. de este capítulo aparecieron dos bandas una amarilla y otra marrón, la primera se eluyó con agua mientras que la banda marrón se quedó retenida en el gel y fue desplazada con NaOH 0,1M.

La figura 33 muestra el Fe total y el Fe(II) medido de acuerdo con Luther y col (1996). La mayor parte del Fe se asocia a los compuestos de alto peso molecular que se eluyen al volumen de exclusión de la columna ( $K_{av} = 0,07$ ). La segunda fracción se observa que es soluble en NaOH 0,1M, y se eluye a un volumen correspondiente a 110-125 mL ( $K_{av}=1,09$ ), también aparecen compuestos de Fe, pero en menor cantidad. Esta claro que el primer pico corresponde a compuestos de peso molecular próximos a 5.000 Daltons, pero no se puede atribuir compuestos de peso molecular inferiores a 100 daltons al segundo pico, teniendo en cuenta la interacción del compuesto con la matriz del gel. Estos efectos ya han sido comentados en los ensayos de fraccionamiento del extracto húmico total, utilizando NaOH 0,1M como eluyente, y por el contrario no habían sido observados en medio acuoso.

Respecto la especiación de Fe se observa que el 84% del contenido en las fracciones se encuentra como Fe(III), pero existe aproximadamente un 16% que se encuentra como Fe(II). Esto es especialmente importante debido a la cinética de oxidación del Fe(II) por el oxígeno y para mantener el Fe(III) en disolución.

## **2.2 Extracto acuoso**

### **2.2.1 Estudio del extracto acuoso sin fraccionar**

El objetivo de la extracción acuosa es la determinación de los complejos Fe-húmicos solubles en agua, a fin de evaluar su comportamiento en la solución del suelo. Dado que el



#### IV Interacción Fe-materia orgánica

extracto acuoso no se purificó, el sólido puede presentar, además de materia orgánica, sales y otros compuestos solubles en agua que no son el objetivo de nuestro estudio. Por este motivo, la exposición de los resultados se limitará a las posibles sustancias húmicas presentes en este extracto y sus asociaciones con Fe, independientemente de otros posibles compuestos.

Los resultados para el análisis elemental (C, H, N y S), así como los datos de porcentaje de Fe se expresan en la tabla 20. El porcentaje total de los elementos que aparecen en dicha tabla apenas supera el 20 %, dato que indica la presencia de otros elementos solubles existentes en el material de partida. No se incluye el valor del oxígeno, ya que el error es muy importante cuando se calcula por diferencia respecto de los elementos restantes.

El porcentaje de C obtenido en el análisis elemental de la fracción soluble en agua es muy bajo, tal como ocurre también con los datos obtenidos para el Fe, pero indica que pueden existir complejos Fe-húmicos solubles en agua. Destaca el elevado valor mostrado por el S.

**Tabla 20** Análisis elemental y Fe total para el liofilizado resultante de la extracción en agua.

C (%)	2,96
H (%)	3,12
N (%)	3,66
S (%)	11,73
Fe (%)	0,007

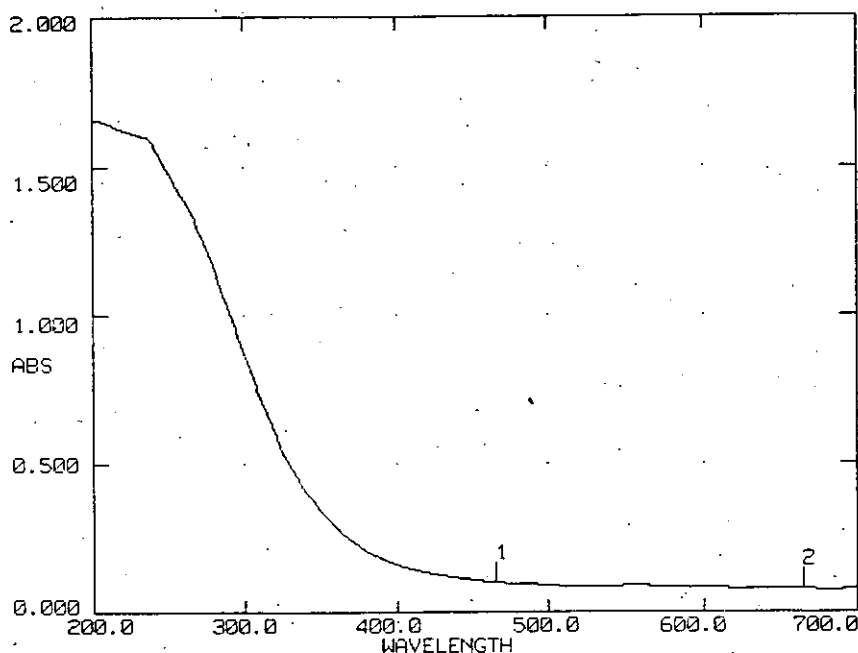
El espectro UV-visible del extracto acuoso en solución acuosa (pH 6,75) aparece en la figura 34. Se observa ausencia de picos definidos, pero se observa una fuerte absorción en el UV. En esta zona del espectro la absorbancia se incrementa cuando decrece la longitud de onda y aparece una banda ancha compatible con un ácido fúlvico. La absorbancia a 465 nm es 0,103 para las condiciones mencionadas, lo que indica presencia de C orgánico. Con estos datos se puede indicar que se solubiliza materia orgánica, principalmente como compuesto fúlvico.

A continuación se realizó el mismo estudio espectroscópico del extracto acuoso pero en NaOH 0,1M. En dicho estudio, aparece un pico definido a 282 nm, idéntico al obtenido en el caso del extracto húmico total, pero con un valor de absorbancia mayor.

#### IV Interacción Fe-materia orgánica

También la relación  $E_4/E_6$ , está próxima, (4,2 ) y la absorbancia a 465 nm disminuye con un valor de 0,070.

**Figura 34** Espectro de UV-visible para el extracto acuoso



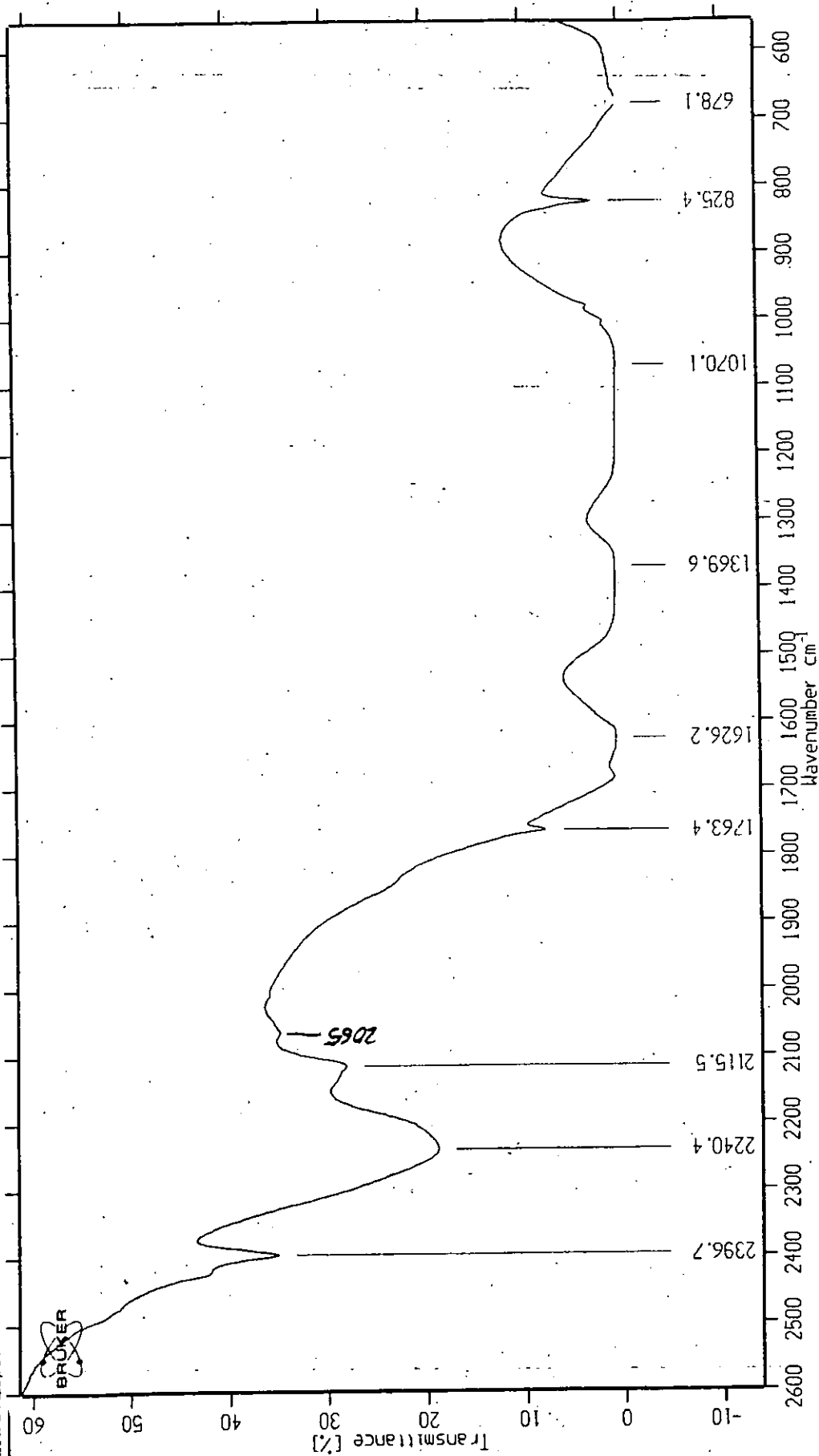
Uno de los principales inconvenientes de la obtención de los espectros IR de sustancias húmicas en sistemas acuosos es la presencia de dos bandas anchas e intensas a 3400 y 1640  $\text{cm}^{-1}$  que enmascaran la zona de mayor interés en el espectro de las sustancias húmicas. El espectro FTIR para el extracto acuoso se realizó en dos aparatos diferentes, obteniéndose los espectros mostrados en la figura 35 y 36. La figura 35 se corresponde con el espectro FTIR obtenido con un aparato Bio-Rad, mientras que para efectuar el de la figura 36 se utilizó un aparato Bruker. Las ventajas de este segundo aparato respecto del primero es la desecación previa de las muestras y que la medida se realiza en vacío.

Los dos espectros muestran una banda muy ancha en la región de 3400  $\text{cm}^{-1}$ , como consecuencia de la presencia del agua coordinada. Esta banda oculta las posibles bandas de tensión de los OH correspondientes a los grupos fenólicos. Lo mismo ocurre con la banda a 1600  $\text{cm}^{-1}$  que interfiere en la determinación de los grupos carbonilo. No se encuentran bandas características de las sustancias húmicas, excepto la banda de 1760  $\text{cm}^{-1}$  asignada



#### IV Interacción Ec-materia orgánica

Figura 36 Espectro FTIR del extracto acuoso sin fraccionar (FTIR Bruker-IFS66V)



#### IV Interacción Fe-materia orgánica

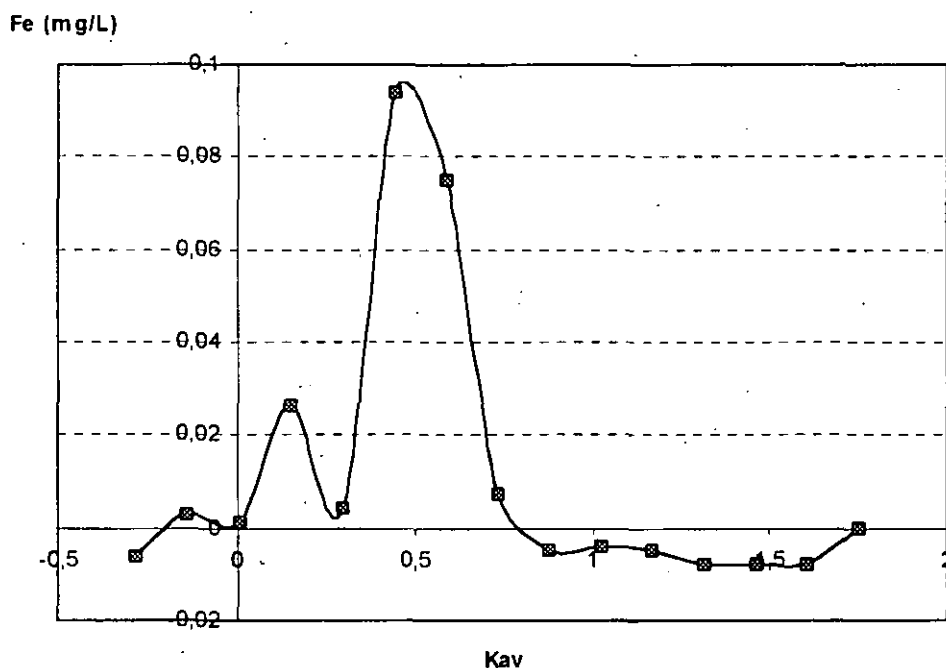
a los grupos ester de las sustancias húmicas. La existencia de bandas en la región de 900-650  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de núcleos aromáticos, aunque no podemos asegurar su grado de sustitución.

##### 2.1.2 Fraccionamiento del extracto acuoso.

###### A) Sephadex G-15

La figura 37 recoge los contenidos de Fe total en función de  $K_{av}$ , para cada una de las fracciones obtenidas cuando se eluyeron 10 mg del extracto acuoso por una columna con Sephadex G-15. El perfil de elución muestra dos picos importantes que se presentan después del volumen de exclusión de la columna. Estos datos indican que el extracto acuoso presenta un peso inferior a 1.500 Dalton. Del mismo modo, la fracción que tiene menor peso molecular es la que lleva asociado el mayor contenido de Fe.

Figura 37 Concentración de Fe total en cada una de las fracciones del extracto acuoso eluidas en sephadex G-15



#### IV Interacción Fe-materia orgánica

El altura de pico para la primera fracción es 0,02 mg/L, mientras que la fracción de menor peso molecular alcanza valores próximos a 0,1 mg/L. Considerando que añadimos 10 mg de extracto, que supone 0,0007 mg Fe añadidos prácticamente se eluye todo el Fe (0,0006 mg Fe).

##### *B) Sephadex G-25*

Cuando el extracto acuoso se fraccionó con Sephadex G-25, se midió el Fe total por absorción atómica en cada una de las fracciones directamente después de acidificar las fracciones con HCl al 2%. La medida directa de Fe en las fracciones mostró que ninguna de ellas presentaba asociaciones de este metal, ya que se obtuvieron valores de absorbancia próximos al blanco, (datos no mostrados). Considerando estos niveles como válidos, dados los bajos contenidos de Fe en el extracto acuoso cabría concluir que el Fe presente en el extracto acuoso no se encuentra asociado con ninguna fracción que presente pesos moleculares superiores a 5.000 Daltons. Dato éste que ya se había observado en el fraccionamiento con Sephadex G-15.

**V. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ÁCIDO-BASE DE  
LOS ÁCIDOS FÚLVICOS.**

## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1 Extracción y purificación de los ácidos fúlvicos.

La extracción de los ácidos fúlvicos se hizo de acuerdo con el método propuesto por la International Humic Substances Society (1983). Este procedimiento de extracción de sustancias húmicas es de tipo secuencial: principiando por su realización en medio acuoso ácido y continuando, posteriormente, en un medio acuoso alcalino. La primera extracción da rendimientos bajos pero ésta mejora cuantitativamente en la segunda. Así, el objetivo de la extracción ácida es eliminar carbonatos, otras sales y cationes floculantes, especialmente el Fe que se presenta en elevadas concentraciones en el Aquamato Férrico. La extracción alcalina es la solubilización del propio humus.

Este proceso consiste básicamente en la extracción con NaOH 0,1M, separación de los ácidos fúlvicos en HCl a pH 1-2, adsorción en columna de XAD-7 y posterior desorción con NaOH. La extracción de silicatos se llevó a cabo mediante tratamiento con una disolución diluida de HF y posterior purificación de la disolución con XAD-7. A continuación, se hace pasar el ácido fúlvico sobre una resina de intercambio iónico de Amberlita protonada para obtener los ácidos fúlvicos exentos de Na. Finalmente, la disolución obtenida se liofiliza para dar los ácidos fúlvicos en polvo completamente seco.

Seguidamente se describe el esquema de la extracción y purificación de los ácidos fúlvicos.

#### Esquema general del proceso

#### Extracción ácida

1. Aquamato férrico seco al aire (35 g)
2. En un vaso de precipitados de 1000 ml se añadió 7 ml de HCl 1:1, hasta pH 1
3. Añadir 343 ml de agua, 1:10 peso: volumen y una concentración de [HCl] final 0,1 N
4. Agitación magnética durante 1 hora
5. Centrifugar a 5000 rpm en una centrifuga Beckman J2HS



## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

Las sustancias húmicas forman complejos con los metales cuya solubilidad depende del pH, de la presencia de sales y del grado de saturación de los sitios de enlace (Stevenson, 1994). Debido a su menor peso molecular y al elevado número de grupos funcionales ácidos, los complejos metálicos de ácidos fúlvicos son menos susceptibles a precipitar que los ácidos húmicos. Tanto los ácidos húmicos como fúlvicos actúan como polielectrolitos débilmente ácidos, en los cuales la ionización de los grupos COOH está controlada por el pH, afectando así a la habilidad para enlazar iones metálicos. La determinación de las constantes ácido base permite comprender estos procesos de formación de complejos, al tiempo que proporciona una herramienta necesaria para la especiación química en presencia de estos fulvatos.

Esta determinación resulta, sin embargo, dificultada a causa del elevado grado de oxígenos sustituidos que pueden contener las sustancias húmicas y que produce una mezcla compleja de grupos funcionales ácidos. Para describir sus propiedades ácido base es esencial identificar y cuantificar estos grupos funcionales de forma reproducible, así como determinar con un modelo apropiado y lo más riguroso posible el rango de los valores de pKa que existen.

Las valoraciones directas no son aptas para determinar la acidez total de las sustancias húmicas, ni la debida a sus grupos carboxilos o fenólicos (Perdue, 1985), por ello se han desarrollado modelos matemáticos que describen el enlace protón por las sustancias húmicas. Algunos de estos modelos fueron inicialmente elaborados para otros propósitos, como la descripción del enlace protón por proteínas, ácidos poliméricos, y resinas de intercambio iónicos, entre otros.

Para la obtención de las constantes de acidez en la mezcla de ácidos fúlvicos extraídos del Aquamato férrico se utilizó el modelo de distribución continua previamente desarrollado por Perdue y Lytle (1983). Estos autores consideran que la distribución de grupos funcionales de las sustancia húmicas puede describirse como una mezcla de distribuciones, próxima a una distribución gaussiana para los grupos carboxílicos, y a una distribución similar para grupos fenólicos y otros grupos que presentan acidez más débil.

## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

- a. Residuo: fracción fúlvica del extracto alcalino
- b. Sobrenadante: para extracción alcalina, que en este caso se desechó por el alto contenido en Fe.

### Alcalina

- 6. Neutralizar el residuo con NaOH 0,1N
- 7. Añadir 340 ml de NaOH 0,1 N (1:10 peso:volumen)
- 8. Poner atmósfera inerte N<sub>2</sub>
- 9. Agitar 24 horas
- 10. Centrifugar a 5000 rpm en una centrífuga
  - a. Residuo: material mineral+humina, desechar
  - b. Sobrenadante: para separación de fracciones

### Separación de fracciones

- 11. Acidificar sobrenadante con HCl hasta pH 1, y dejar flocular 12 horas
- 12. Centrifugar en las condiciones anteriores
  - a. Sobrenadante: fracción fúlvica extracto alcalino
  - b. Residuo: fracción húmica extracto alcalino

### Purificación ácidos fúlvicos

#### Cromatografía de absorción

- 13. Pasar la fracción fúlvica del extracto alcalino (sobrenadante del paso 12) por una columna de adsorción XAD-7 (Volumen de columna de 50 ml)
- 14. Lavar con 0,65 volúmenes de columna la columna XAD-7
- 15. Eluir la columna con 1 volumen de columna de NaOH 0,1N y 2 de agua
- 16. Acidificar con HCl hasta pH 1
- 17. Añadir HF, [HF] final 0,3M
- 18. Regenerar la columna XAD-7 (pasar con HCl 0,1 N, 1 volumen de columna)
- 19. Con la mezcla de ácidos fúlvicos repetir los pasos 13, 14 y 15.

#### Cromatografía de intercambio

- 20. Pasar solución de AF por una columna de intercambio catiónico AMBERLIST protonada
- 21. Recoger el eluyente cuando su pH  $\leq$  3
- 22. Regenerar la columna AMBERLIST, (pasar HCl 0,1N, 1,5 volúmenes de columna)

### Liofilización

- 23. Congelar la solución de AF

## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

### 24. Liofilizar en un liofilizador TELSTAR mod. Cryodos

Los AF purificados en polvo se guardaron en un bote de vidrio oscuro y en un desecador de CaO.

### 1.2. Caracterización de los ácidos fúlvicos.

Los ácidos fúlvicos fueron caracterizados a través de su análisis elemental (contenido en C, N, H, S y O) y su absorción en el Infrarrojo mediante la realización de su espectro FTIR. La metodología es la descrita en el apartado de materiales y métodos del capítulo IV, bajo el epígrafe "Estudio de la interacción Fe-materia orgánica por cromatografía de permeación sobre gel".

Las características químicas de los ácidos fúlvicos extraídos es la que seguidamente se indica.

**Tabla 22:** Análisis elemental de la mezcla de ácidos fúlvicos extraídos del Aquamato Férrico

C %	46,80
H %	3,79
N %	1,49
S %	1,24
O%	*53,29
H/C (molar/molar)	1,03
C/N (molar/molar)	36,6

\* Cálculo por diferencia

Los niveles de elementos encontrados en la mezcla de ácidos fúlvicos extraídos del Aquamato Férrico presentan valores normales para ácidos fúlvicos, conforme a lo enunciado por Steelink (1985), Schitzer (1978) y Kononova (1962). El oxígeno presenta un valor un poco elevado que pudiera ser debido al cálculo por diferencia, mientras que, tanto el hidrógeno como el nitrógeno, se encuentran dentro de los límites mínimos.

## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

Boyd y Sommers (1990) indicaron que los contenidos elementales en ácidos fúlvicos procedentes de compost variaban significativamente respecto de los ácidos fúlvicos de suelos. Sin embargo, esta variación no se ha constatado en nuestra experiencia. Tampoco aparecen contenidos de S mucho mayores que los aceptados para ácidos fúlvicos de suelos, ni sus relaciones C/H y C/N difieren de las mencionadas, aunque en nuestro caso el origen del producto sea un medio acuático.

22  
**Tabla 21:** Asignación de las bandas del espectro FTIR para la mezcla de ácidos fúlvicos extraída del Aquamato férrico

Transmisión FTIR (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3431	Tensión O-H
3228	Tensión de C=O
2983	Tensión CH <sub>3</sub> metilcetonas
2937	Tensión asimétrica CH de -CH <sub>2</sub> -
2621	Tensión OH asociada a los ácidos carboxílicos
1719	Tensión C=O del COOH
1634	C=O de los grupos amida, quinona y/o C=O de H enlazado a cetonas conjugadas
1384	Tensión simétrica COO <sup>-</sup> (y deformación CH, tensión CO de OH fenólicos)
1232	Tensión C-O y deformación de COOH, tensión C-O de los aril éteres
1085	Deformación C-H aromática
1044	Flexión COH, tensión C-O de éteres
745	Flexión O-H fuera del plano de los fenoles

Según estos mismos autores, los espectros de IR para los ácidos fúlvicos y húmicos, originados a partir de lodos, son compatibles con los del tipo III de la clasificación de Stevenson y Goh (1971). Esos espectros presentan las bandas características de las sustancias húmicas, pero además aparece una banda fuerte a 1540 cm<sup>-1</sup> debida a la tensión C-O en los polisacáridos, que en nuestro estudio no existe. Teniendo en cuenta que la banda

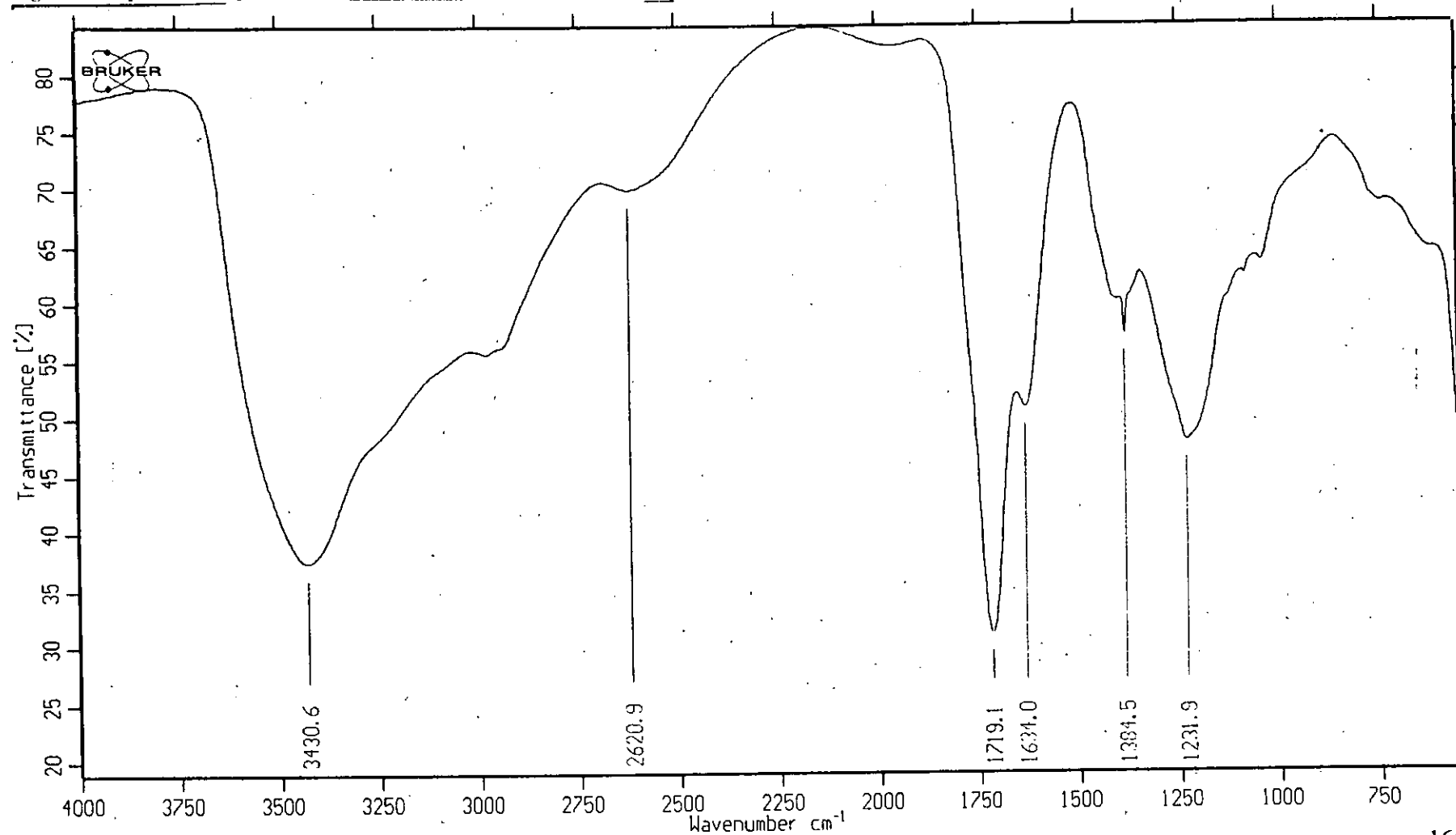
## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

a  $1600\text{ cm}^{-1}$  es inferior a la de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , el ácido fúlvico extraído del Aquamato férrico podría encuadrarse dentro del tipo II, correspondiente a ácidos fúlvicos de bajo peso molecular caracterizados por una fuerte absorción a  $1700\text{ cm}^{-1}$ .

El espectro de la figura 38 muestra un ácido fúlvico con elevada aromaticidad, pero también presencia de sustituyentes alifáticos. La intensidad de la banda a  $1720\text{ cm}^{-1}$  indica que el grupo carbonilo es fuerte, y tanto esa banda como la centrada a  $1634\text{ cm}^{-1}$ , denotan la existencia de grupos C=O y C=C, respectivamente, incluyendo formas conjugadas. La banda a  $1384,5\text{ cm}^{-1}$  confirma la existencia de grupos fenólicos, aunque también puede tener influencia sobre las cadenas alifáticas. Por último se observa una banda ancha centrada en  $1232\text{ cm}^{-1}$  que manifiesta la presencia de grupos oxigenados como fenoles, éteres y quinonas.

Las características espectrales del Extracto húmico total recogidas en la figura 19, capítulo IV, y las mostradas por la mezcla de ácidos fúlvicos son muy similares. Cabe destacar la ausencia de la banda a  $1720\text{ cm}^{-1}$  en el extracto húmico total, apareciendo, sin embargo, otra a  $1584\text{ cm}^{-1}$ , característica de los enlaces iónicos con metales a través del grupo carbonilo. Por otra parte, las bandas a  $1584\text{ cm}^{-1}$  y  $1385\text{ cm}^{-1}$  que reflejan la presencia del ion carboxilato se debilitan en la mezcla de ácidos fúlvicos. A la luz de los datos reseñados, es posible afirmar que el *Extracto húmico total* tiene fundamentalmente una naturaleza fúlvica, con la mayor parte de las posiciones carboxilo ocupadas por iones metálicos, principalmente Fe, como han demostrado los ensayos de fraccionamiento.

**Figura 38** Espectro FTIR para la mezcla de ácidos fúlvicos extraída del Aquamato férrico



## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

### 1.3 Valoraciones potenciométricas.

#### 1.3.1 Descripción del sistema

El sistema de valoración automatizada se presenta esquematizado en la figura 39, donde se indican los siguientes componentes;

Valorador automático Mettler modelo DL77 con microprocesador, y los elementos enumerados a continuación:

*Valorador Mettler (1):* con conexión para dos electrodos de medida, un electrodo de referencia y conexión al ordenador tipo RS-232C. Además presenta tres salidas auxiliares para el agitador, bombas y válvulas. La medida se realiza potenciométricamente en un rango de amplificación de  $\pm 2000$  mV y una resolución de 0,1 mV, 0,002 pH (pM, pX). El punto cero de deriva es menor de  $40 \mu\text{V}/^\circ\text{C}$ .

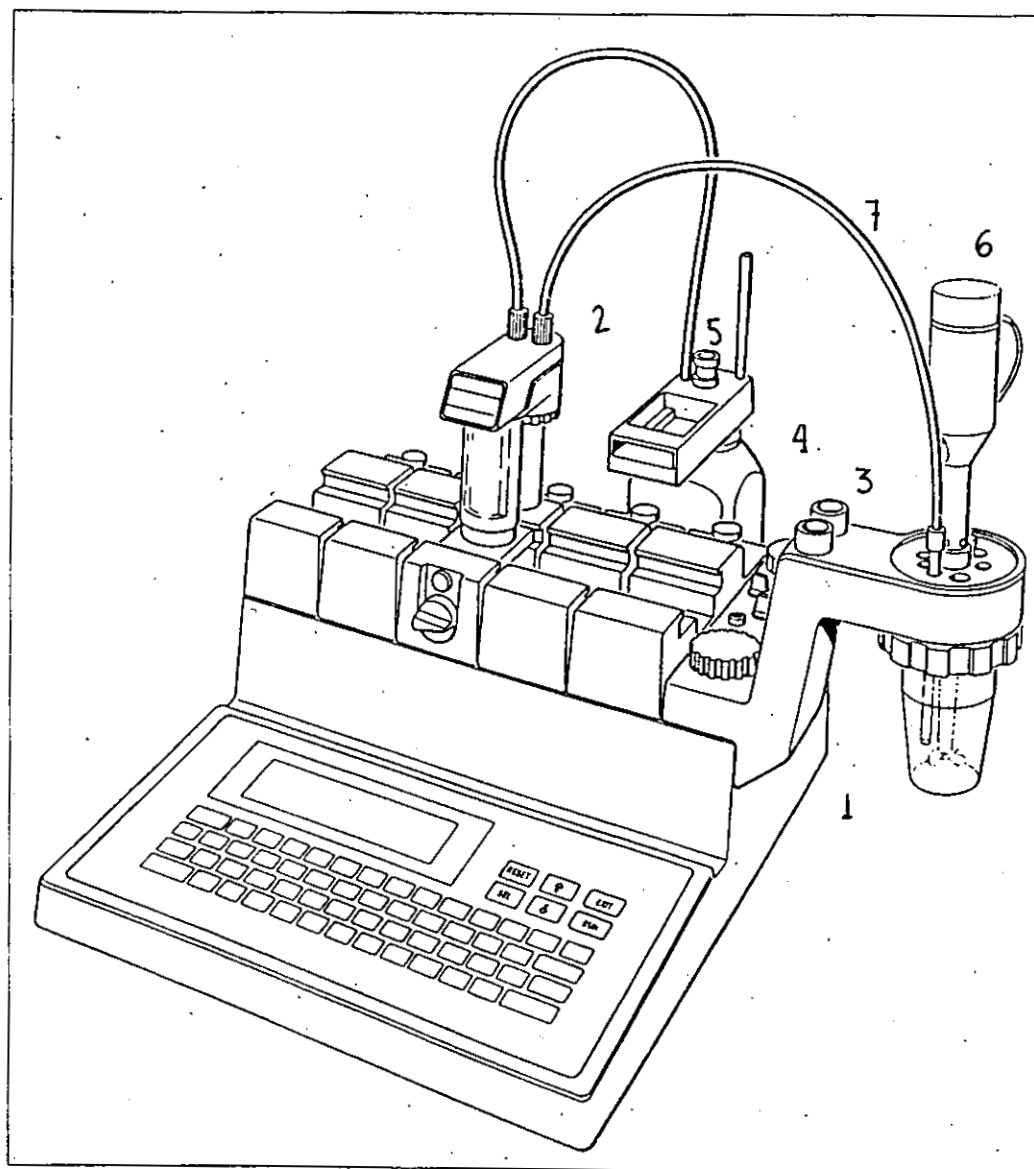
*Equipo de dos buretas automáticas (2):* controladas por el microprocesador del valorador, con intercambiadores de 10 ml capacidad y resolución 1/5000 el volumen de la bureta. Los materiales que presentan contacto con el valorante son vidrio borosilicatado, materiales cerámicos y teflón. Previamente a cualquier valoración las buretas se lavaron con el reactivo que iba a contener.

*Electrodo de medida (3):* para la medida de pH se utilizó un electrodo combinado de vidrio Mettler DG-111-SC. Se usa una disolución de KCl 10% para el electrodo de referencia. Este electrodo se guardó siempre en una disolución tampón de pH 7,00 cuya fuerza iónica se había ajustado a 0,1 M con  $\text{KNO}_3$ . Antes de introducirlo en el vaso de reacción se lavó bien con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada.

*Botellas de reactivo y tubos desecadores (4 y 5):* cada botella de reactivo se presentaba conectada a la bureta a través de los soportes de los intercambiadores. Estos soportes se ajustaban a modo de tapón y presentaban un tubo de aspiración que va a la jeringa de la microbureta y otro dispensador de la microbureta a la celda de reacción. Los

V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

**Figura 39** Esquema del valorador automático





## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

tubos dispensadores estaban fabricados de polietileno. Los soportes presentaban además otro orificio para la sujeción de un tubo desecador modelo 23961 de Mettler relleno de CaO (Reactivo análisis) que sirve como absorbente de  $H_2O$  y  $CO_2$ .

*Agitador de hélice (6)*: colocado en el interior de la celda de reacción con una velocidad máxima en agua de 3500 rev/min.

*Brazo de teflón (7)*: conecta el valorador con la celda de reacción. Este brazo presenta seis agujeros donde se insertan el agitador, el electrodo de vidrio y los tubos dispensadores de reactivos valorantes y de  $N_2$ .

*Celda de reacción termostatzada (8)*: con 80 ml de capacidad acoplada al valorador por un brazo y ajustada herméticamente al valorador por una anilla de teflón y una tuerca del mismo material.

Independiente del valorador el sistema de valoración automatizada presentaba:

*Baño termostático*: modelo Digiterm 100 de selecta con sonda de temperatura y permite mantener constante la temperatura del baño con una precisión  $\pm 0,1^\circ C$ . El baño lleva un dispositivo que permite bombear el agua del baño al exterior, con lo cual se envía agua hacia el baño termostático.

*Sistema de burbujeo de  $N_2$* : consiste en una botella de  $N_2$  dC-55 de Carburos metálicos y dos frascos lavadores (250 mL) por donde pasa el  $N_2$  antes de llegar a la celda de reacción. En el primero de los frascos lavadores (más cercano a la botella) hay unos 150 mL de KOH 0,1 M que tiene por finalidad de eliminar las impurezas de  $CO_2$  presentes en el gas. En el segundo se adicionaron unos 150 mL de  $H_2O$  ultrapura con el fin de humificar el gas y que el burbujeo en la disolución de medida no produzca una evaporación de agua con la consiguiente concentración. El gas se burbujea en la disolución a través de un tubo de vidrio de 5 mm de diámetro.

*Ordenador personal*: con un puerto Serie RS-232C para la recepción de los datos

experimentales.

### **1.3.2. Funcionamiento del sistema**

Los criterios de medida y adición de reactivo se ajustaron a los descritos por De la Torre (1993) para la determinación de las constantes de ácidos fúlvicos procedentes de suelos del Montseny y las características del valorador. A continuación se detallan la adquisición de datos y adición de valorante, incluyendo entre paréntesis la opción elegida de acuerdo con la denominación de METTLER

La adquisición de la medida se realizó a equilibrio controlado (EQU), es decir, el equilibrio debía establecerse en la solución antes de que el valorador aceptase un valor. Los parámetros responsables del equilibrio son  $\Delta E/\Delta t$ , incremento del potencial en la disolución con el tiempo. En cuanto al criterio fijado se aceptaron como tolerables derivas en torno a  $0,1-0,2 \text{ mV}\cdot\text{min}^{-1}$ . El tiempo máximo de medida para evitar que una lectura inestable tuviera la valoración detenida durante mucho tiempo, se estableció entre 5 y 15 minutos según los casos.

En las valoraciones de estandarización y calibración, el volumen se adicionó con incrementos constantes (INC) y las dosificaciones se hicieron depender del pH. En las valoraciones de ácidos fúlvicos se escogió la adición dinámica de reactivo (DYN), calculando el incremento de potencial  $\Delta E$  de las dos últimas adiciones, con un incremento prefijado que deseábamos se mantuviera constante durante la valoración.

El fin de la valoración viene indicado por el pH final de la valoración. El valorador va grabando en un fichero la información correspondiente a cada punto de la valoración y una vez finalizada exporta todos datos al disco duro del ordenador.

### **1.3.3. Obtención de datos experimentales con potenciometría**

Para evitar la contaminación con la materia orgánica, todo el material de vidrio utilizado en la preparación de las disoluciones y en la valoración se mantuvo al menos

## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

durante 2 horas en disolución de mezcla crómica, y otras 2 horas en disolución de NaOH 1M. Previamente a la preparación de las disoluciones, los matraces aforados y botellas de almacenamiento definitivo de patrones permanecieron toda la noche llenas de agua destilada de calidad Milli-Q.

### *1.3.3.1. Factorización del KOH y del HNO<sub>3</sub>*

El KOH se valora frente a un patrón primario de ftalato ácido de potasio (KHF). Inmediatamente a continuación, y en la misma disolución, se estandariza el HNO<sub>3</sub> valorante frente al exceso del KOH ya normalizado. El punto de equivalencia se calcula mediante la aplicación de la función de Gran en la zona alcalina de la valoración, tomándose las lecturas después del punto de equivalencia del KHF.

Para la valoración se preparó, mediante pesada, una disolución patrón 0,001 M de KHF (PANREAC PR), previamente desecado a 105 °C. Se introdujeron 25 ml de esta disolución en la celda de reacción a 25,0 ± 0,1 °C, se agitó y en presencia de N<sub>2</sub>, y a continuación se añadieron:

- 10 alícuotas de 20 µL de KOH 0,1 M aprox.
- 450 µL de KOH para pasar el punto de equivalencia
- 10 alícuotas de 20 µL de HNO<sub>3</sub> 0,1 M aprox.

Los cálculos se realizaron de acuerdo con la ecuación (5):

$$10^{(-E/S)V_t} = -V_{KHF} M_{KHF} 10^{(-E_o^H/S)} + 10^{(-E_o^H/S)} M_{KOH} V_{KOH} \quad (5)$$

donde E es el potencial medido (mV), S la pendiente del electrodo, V son los distintos volúmenes adicionados, y E<sub>o</sub><sup>H</sup> es el potencial de referencia del electrodo. La ecuación es una recta donde el término a la izquierda de la igualdad es la variable dependiente y V<sub>KOH</sub> la variable independiente. El cálculo de la molaridad real del KOH se efectúa a partir del volumen equivalente y éste es el cociente entre la ordenada en el origen de la recta y la

## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

pendiente.

En el caso de la valoración del ácido, la ecuación (6) utilizada es similar teniendo en cuenta la cantidad de álcali añadido previamente,

$$10^{(-E/S)} V_t = -(V_{KOH} M_{KOH} - V_{KHF} M_{KHF}) 10^{(-K/S)} - 10^{(-K/S)} M_H \cdot V_H \quad (6)$$

El volumen de ácido equivalente es la ordenada en el origen dividido por la pendiente de la recta y la molaridad del ácido se calcula según la ecuación (7);

$$M_H = \frac{V_{OH} M_{OH} - V_{KHF} M_{KHF}}{V^{Eq_H}} \quad (7)$$

En todas las valoraciones se aceptaron como buenas las valoraciones que daban un coeficiente de Pearson ( $r^2$ ) de la función de Gran de al menos 0,999. Los cálculos se realizaron mediante una hoja de cálculo Microsoft Excel 97.

Las concentraciones de KOH y HNO<sub>3</sub> obtenidas tras la estandarización con KHF 0,001 M, se corresponden con 0,115 M de KOH y 0,156 M para el HNO<sub>3</sub>.

### *1.3.3.2. Determinación del Kw a fuerza iónica I=0,100 M*

Todas las valoraciones se realizaron a fuerza iónica constante y la calibración del electrodo se efectuó en unidades de concentración de H<sup>+</sup>, por estas razones es necesario conocer el valor de la constante de ionización del agua Kw. El método seguido es el descrito por Marqués (1989). Se realizaron dos calibraciones una en medio ácido y otra en medio básico sin sacar el electrodo de la disolución, con el fin de obtener la constante del electrodo E<sub>0</sub> y a continuación determinar K<sub>w</sub>. La determinación se realiza a 25 °C y en atmósfera de N<sub>2</sub> por lo que la pendiente del electrodo se mantiene igual a 59,157 mV.

## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

Las adiciones son las siguientes:

- ▶ 20 mL de  $\text{HNO}_3$  0,001 M a  $I = 0,100$  M en celda de reacción
- ▶  $10 \times 10 \mu\text{L}$  KOH Calibra  $E_o^H$  (pH 3-3,5)
- ▶ 400  $\mu\text{L}$  KOH Sobrepasa el punto de equivalencia
- ▶  $10 \times 10 \mu\text{L}$   $\text{HNO}_3$  Calibra a  $E_o^{OH}$  (pH 11)

Para calcular el valor de  $E_o^H$  se determina el valor  $V_{eq}^{OH}$  gráficamente, mediante la función de Gran, de acuerdo con la ecuación (8)

$$10^{(E/S)} V_t = 10^{(E_o^H/S)} V_{H^+}^i M_{H^+}^i - 10^{(E_o^H/S)} M_{OH^-} V_{OH^-} \quad (8)$$

donde E es el potencial leído (mV), S la pendiente teórica del electrodo,  $V_t$  el volumen total y los superíndices indican cantidades iniciales previas a la valoración. El volumen de KOH equivalente, es de nuevo el cociente entre la ordenada en el origen de la recta y la pendiente.

Una vez hallado este volumen equivalente, se calcula la  $[H^+]$  y  $E_o^H$  en cada punto de la valoración según las ecuaciones (9) y (10):

$$[H^+] = \frac{(V_{eq}^{OH} - V_{add}^{OH}) M_{OH}}{V_t} \quad (9)$$

$$E_o^H = E - S \log [H^+] \quad (10)$$

Del conjunto de datos de  $E_o^H$  se calcula la media. El cálculo de  $E_o^{OH}$  es similar, pero se realiza con los datos posteriores al punto de equivalencia.

Una vez calculados  $[H^+]$  y  $[OH^-]$  se sustituyen sus valores en la ecuación de

## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

ionización del agua por sus valores en la ecuación de Nerst, obteniéndose la ecuación (11)

$$pK_w = \frac{E_o^H - E_o^{OH}}{S} \quad (11)$$

En la tabla 24 aparecen los cálculos de  $K_w$  realizados en dos valoraciones sucesivas. La media de este valor se utilizará para los cálculos de protonación de la mezcla de ácidos fúlvicos.

**Tabla 22** Cálculo de  $K_w$  a  $I = 0,1$  M mediante calibración del electrodo en pH ácido y alcalino

	[KOH]	$V_{eq}^{OH}$	[HNO <sub>3</sub> ]	$V_{eq}^H$	$E_o^H$	$E_o^{OH}$	$pK_w$
1	0,1149	309,3	0,156	149,9	$390,6 \pm 0,2$	$406,9 \pm 0,1$	13.48
2	0,1149	304,8	0,156	150,8	$391,48 \pm 0,04$	$403,8 \pm 0,4$	13.44

### *1.3.3.3. Calibración del electrodo de pH*

Con carácter previo a la valoración ácido-base realizamos una calibración del electrodo de pH en concentración. Esto implica el cálculo de  $E_o^H$  correspondiente a la fuerza iónica de la valoración. Dadas las condiciones de temperatura y atmósfera de  $N_2$ , consideramos  $S$  constante y a partir del potencial leído se puede deducir la concentración de protones en la disolución. Esta medida resultará posible en tanto se mantenga constante la fuerza iónica. Las ventajas que presenta esta forma de calibración fueron explicadas por De la Torre (1993) y entre ellas se puede destacar la posibilidad de realizar las medidas de actividad, transformando, a su vez, estos datos en concentración en ecuaciones teóricas. Además, el error se mantiene constante ya que el electrodo no se extrae de la disolución y su valor absoluto queda incluido en el valor de  $E_o^H$  calculado.

Para la calibración del electrodo de pH se realizaron los siguientes pasos:

► 25 mL de  $HNO_3$  0,001 M a  $I = 0,100$  M en celda de reacción

#### V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

- 10 x 10  $\mu\text{L}$  KOH
- Continúa la valoración del ácido fúlvico

El cálculo de  $E_o^H$  se realiza como en el apartado anterior ecuaciones (9) y (10).

##### *1.3.3.4 Valoración ácido base del ácido fúlvico*

De acuerdo con los ensayos efectuados por De la Torre (1993), se prepararon dos disoluciones madre de AF de 200 y 400  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en  $\text{KNO}_3$  0,100 M, utilizando material de vidrio cuidadosamente lavado. Una vez hecha la mezcla, se agitaron durante una noche para su total disolución y se dejaron reposar como mínimo durante cinco días, antes de su utilización. En todos los casos se obtuvieron disoluciones transparentes. Estos patrones fueron conservados en botellas de vidrio opaco y en nevera aproximadamente a 5 °C.

El  $\text{KNO}_3$  se añadió para ajustar la fuerza iónica de estas disoluciones madre. Para ello no se tuvo en cuenta la contribución de los AF a la fuerza iónica total, habida cuenta que es muy reducida, por lo que se añadió la cantidad necesaria para preparar una disolución 0,100 M de  $\text{KNO}_3$ .

La valoración ácido-base de los AF sigue la misma metodología descrita por De la Torre (1993) para la determinación de la distribución de las constantes ácido-base de una mezcla de ácidos fúlvicos extraídos de suelos del Montseny. Como reactivos fueron utilizados KOH 0,1 M y  $\text{HNO}_3$  0,1 M previamente estandarizados. También se determinó el valor de la constante  $K_w$ . Tanto la estandarización de los reactivos como el cálculo de la  $K_w$  se realizaron de acuerdo con los apartados 1.3.3.1 y 1.3.3.2 de este capítulo, respectivamente.

Inmediatamente antes de la valoración, se hizo una calibración del electrodo de vidrio con 25,0 mL de una disolución de  $\text{HNO}_3$  0,001 M aprox. y adiciones de KOH 0,1 M, del mismo modo que se describe en el apartado 1.3.3.3. Una vez finalizada la calibración, se añadieron 20,0 mL de disolución madre de AF, comenzando la valoración con KOH hasta pH 11, para a continuación valorar por retroceso con  $\text{HNO}_3$  hasta pH 2,5.

## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

Las adiciones de reactivo fueron variables con el fin de lograr un incremento de las mismas características del potencial leído. Las condiciones de la valoración introducidas en el programa control se enuncian a continuación:

- ▶Tiempo mínimo de comprobación: 300 segundos
- ▶Deriva máxima admitida:  $0,1 \text{ mV} \cdot \text{min}^{-1}$
- ▶Intervalo cte de potencial: 7 mV
- ▶Dosis máxima dispensada: 200  $\mu\text{L}$
- ▶Dosis mínima dispensada: 2  $\mu\text{L}$

Siendo las cantidades que se aportaron las siguientes:

- ▶25 mL  $\text{HNO}_3$  0,001 M aprox. con  $I=0,100\text{M}$  de  $\text{KNO}_3$
- ▶10x10  $\mu\text{L}$  KOH = 100  $\mu\text{L}$
- ▶volumen inicial 45,1 ml
- ▶1,26 mL de KOH 0,1 M
- ▶2,44 mL de  $\text{HNO}_3$  0,1 M

Por último, se realizaron 3 valoraciones de las madres de 200 y 400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de AF, y se aplicó el modelo a las seis valoraciones.

Resta indicar que en el programa de ajuste FGMINC se introducen como variables la concentración de H y de ligando libre, calculando esta última a partir del balance de cargas aplicado a cada punto de la valoración, según describe De la Torre (1993).

## **2. RESULTADOS**

### **2.1 Valoraciones ácido base de ácidos fúlvicos.**

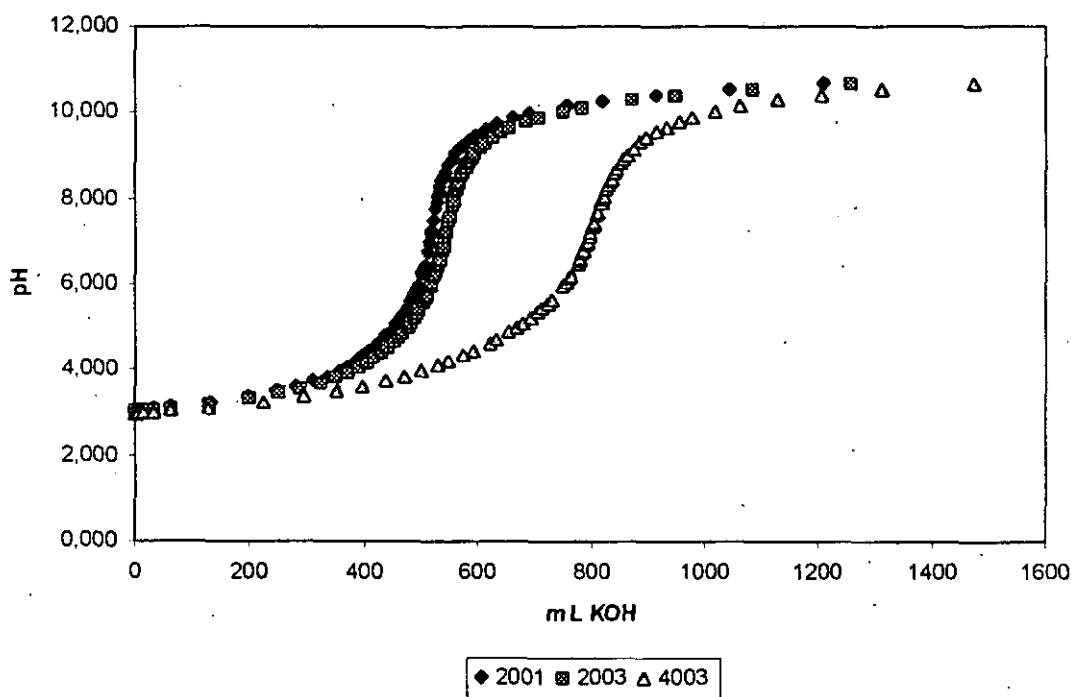
La figura 40 muestran las curvas de valoración para la mezcla de ácido fúlvicos extraídos a partir del Aquamato Férrico y en los dos intervalos de concentraciones estudiadas; 200 y 400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .



## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

La interpretación de las curvas de valoración de las sustancias húmicas es compleja, pero según Stevenson (1994) pueden identificarse tres zonas. Los extremos se corresponden con las zonas de mayor acidez, donde se disociarían los grupos  $\text{COOH}$  y con la zona poco ácida, atribuida a los grupos  $\text{OH}$  y otros tipos de ácidos débiles. Por su parte, en la zona intermedia se superpone la ionización de grupos ácidos débiles ( $\text{COOH}$ ) y muy débiles ( $\text{OH}$ ). La acidez del grupo carboxilo depende del entorno por lo que, según ese autor, no se deberían considerar idénticos todos los grupos carboxilo.

**Figura 40** Curvas de valoración para la mezcla de ácidos fúlvicos extraídos a partir del Aquamato férrico y en los dos intervalos de concentraciones estudiadas; 200 y 400  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .



Lo cierto es que la selección del punto final de la valoración entraña dificultades dada la naturaleza de la curva. Aunque algunos autores defiendan el uso de métodos gráficos a partir de las valoraciones directas, bien aplicando modificaciones de los métodos de Gran (Gamble, 1972) o bien fijando un pH próximo a 8 como criterio de punto final en la valoración (Flaig y col, 1975), estas valoraciones directas no son el método más apropiado para la determinación de las constantes de acidez de un ácido fúlvico.

Por este motivo, y como ya se ha indicado, se aplicará a los datos experimentales

## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

un modelo de distribución continua. Este presenta la limitación de considerar únicamente los grupos cargados influyen sobre la acidez de los grupos funcionales, por lo que sólo se tiene en cuenta los efectos estadísticos y electrostáticos de dichos grupos. No obstante, en la medida en que también toma en consideración la concentración relativa de cada ligando distribuida normalmente en relación al pK del ligando, este modelo aporta una buena aproximación a cual sea la distribución más probable de los grupos funcionales ácidos en sustancias húmicas (Perdue, 1985).

### **2.2. Aplicación del modelo de Distribución continua**

A las seis valoraciones ácido base realizadas con los ácidos fúlvicos extraídos a partir del Aquamato férrico se les aplicó el modelo de ajuste FGMINC. El valor medio de cada uno de los parámetros calculados por el modelo a las valoraciones que presentaron mejores ajuste, se tomó como dato para recalcular las concentraciones y el SCR. En concreto, se seleccionaron tres valoraciones, dos de 200 y otra de 400 mg·L<sup>-1</sup>.

En la figura 41 se exhiben las curvas correspondientes a las tres valoraciones escogidas para la aplicación del modelo, incluyendo todos los datos obtenidos en la valoración. Las líneas continuas corresponden a los datos que resultaron tras la aplicación del modelo, mientras los puntos muestran los datos experimentales.

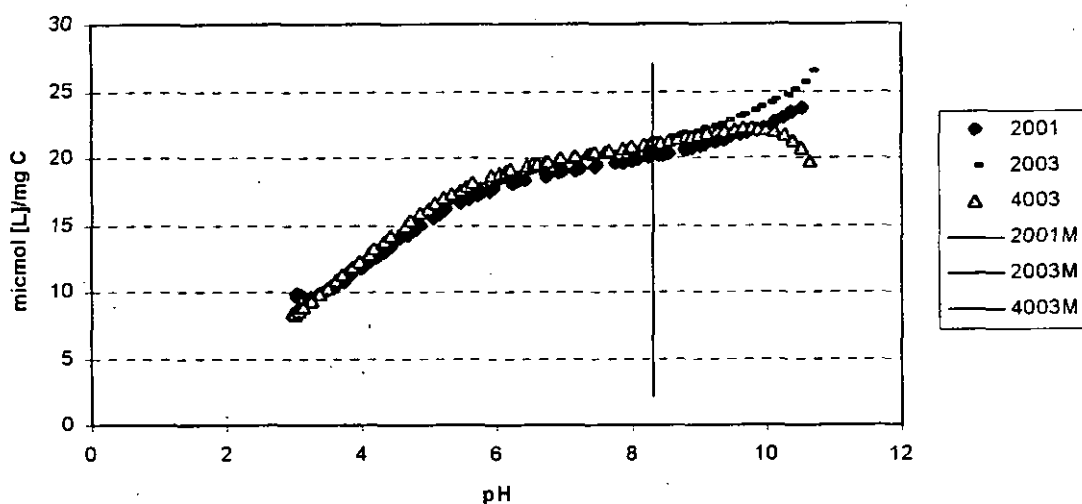
Puede observarse que a pHs inferiores a 8,5 el comportamiento ácido base es independiente de la concentración de ácido fúlvico (el modelo describe muy bien esta tendencia). A partir de ese punto, la tendencia es diferente para cada rango de concentración, marcándose estas diferencias a partir de pH 10. Esto es particularmente importante, si tenemos en cuenta que a partir de pH 8,5 se produce la disociación de los grupos fenólicos. Borggaard (1974) explicó este efecto con fundamento en la autooxidación de la materia orgánica en presencia de trazas de O<sub>2</sub> y concentraciones de álcali elevadas. Este efecto se incrementa cuando las adiciones de álcali se efectúan lentamente en periodos prolongados de tiempo.

De la Torre (1993) apreció este comportamiento divergente a partir de pH 10,

## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

atribuyéndolo al error indeterminado asociado al cálculo de la concentración de ligando. De otro lado, la divergencia encontrada era mayor en la valoración de  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  lo cual estaba en consonancia con el cálculo de propagación de errores. El error se incrementaba cuando además se consideraba el error asociado a la concentración de KOH añadida, especialmente importante al final de la valoración. Por este motivo, el autor puso énfasis en el hecho de realizar estas valoraciones a elevadas concentraciones de ácidos fúlvicos.

**Figura 41** Valoración ácido-base de la mezcla de ácido fúlvicos y curva estimada por el modelo.



En el caso que nos ocupa, el modelo describe bien el comportamiento de la disolución ácido base, especialmente cuando la concentración de la mezcla de ácidos fúlvicos es  $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Dado que la valoración fue realizada en atmósfera de  $\text{N}_2$  y las adiciones se realizaban cada dos minutos (tiempo que tardaba en estabilizarse el electrodo), cabría imputar al error asociado a la concentración añadida el motivo por el que el modelo no describiría correctamente la curva de valoración a  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a pH elevados.

Siguiendo a De la Torre (1993), para el cálculo de las constantes sólo se utilizaron los lotes de datos inferiores a pH 10. Los resultados se muestran en la tabla 25 y corresponden al promedio de los ajustes de las tres valoraciones mencionadas. De acuerdo con el modelo de distribución normal Gaussiana, la distribución está definida por dos medias  $\mu_1$  y  $\mu_2$ , dos desviaciones típicas  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$  y dos valores de concentración de puntos

## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

de enlace  $C_1$  y  $C_2$ . Esta suposición es bastante aproximada a la realidad de los  $pK_a$  mayoritarios de los grupos ácidos existentes en la mezcla de AF, que se agrupan en torno a dos valores cercanos a los correspondientes a los grupos carboxílicos y fenólicos.

Los valores obtenidos para  $\mu$  y  $\sigma$  se acercan a los encontrados en otros estudios recogidos en la bibliografía, especialmente a los descritos por De la Torre (1993). El hecho de haber seleccionado los datos según su criterio puede influir en que los resultados estén más próximos a sus valores que a los de Perdue, especialmente en lo referente a los puntos de enlace tipo fenólico. Sin embargo, la concentración de grupos carboxilo duplica a los 10 moles  $C \cdot g^{-1}C$  citados por Perdue (1990) como promedio de grupos ácidos carboxílicos en extractos de sustancias húmicas.

**Tabla 23** Resultados de la calibración del modelo con las valoraciones ácido-base de la mezcla de ácidos fúlvicos extraídos del Aquamato Férrico

	AF Aquamato Férrico	AF Montseny (de la Torre 1992)	D.O.M. (Perdue, 1984)
$\mu_1$	3,244	3,763	3,70
$\mu_2$	10,344	10,533	12,50
$\sigma_1$	1,929	1,527	2,50
$\sigma_2$	3,115	2,071	1,84
$C_1$	19,24	12,50	
$C_2$	7,231	7,836	0,499
SCR	2,903	0,1270	$5 \cdot 10^{-5}$

Un dato relevante que debe ser considerado es el valor especialmente elevado de SCR que debería ser mínimo para un buen ajuste. Pero como puede verse en la tabla 26,<sup>25</sup> cuando se aplicó el modelo de forma independiente a cada valoración en ningún caso superó 0,1, incluso en aquellos casos que se rechazaron por desviarse sus valores del promedio, por lo que se considera el ajuste adecuado.

## V. Estudio ácido-base de los ácidos fúlvicos

**Tabla 24** Resultados de la calibración del modelo aplicado a cada una de la repeticiones que han sido utilizadas para la determinación de las constantes ácido-base.

	200 mg·Kg <sup>-1</sup>		400 mg·Kg <sup>-1</sup>
$\mu_1$	2,31	3,17	3,37
$\mu_2$	10,78	10,31	9,95
$\sigma_1$	2,310	1,794	1,68
$\sigma_2$	3,36	3,12	2,86
$C_1$	19,23	18,79	19,60
$C_2$	6,57	9,96	5,15
SCR	0,056	0,163	0,053

Dado que el principal objetivo de este ensayo era encontrar un valor adecuado para las constantes de acidez de la mezcla de ácidos fúlvicos, y no tanto su contenido en grupos carboxilos y fenólicos que ya se ha descrito por los análisis de FTIR, ha de considerarse como aceptables los valores obtenidos para  $\mu$  y  $\sigma$ .

## **VI. VALIDACIÓN AGRONOMICA DE LOS PRODUCTOS**

## VI Validación agronómica de los productos

Se ha constatado que en condiciones de adecuada nutrición mineral, el uso de las sustancias húmicas produce efectos positivos sobre el crecimiento vegetal. El más común es el incremento de la biomasa, siendo la estimulación más efectiva en el crecimiento radicular que en el tallo. En disoluciones nutritivas, la respuesta típica observada muestra un aumento del crecimiento directamente proporcional a la concentración de sustancias húmicas, que se invierte cuando éstas alcanzan concentraciones muy elevadas.

En la introducción se ha sido indicado que entre las aplicaciones agronómicas de estas sustancias destacan la estimulación del crecimiento, la corrección de deficiencias de micronutrientes y su utilización como enmiendas orgánicas en sustratos con bajos contenidos de materia orgánica, principalmente destinados a cultivos intensivos.

Para evaluar los efectos del Aquamato férrico y del Doliron dentro de sus diferentes aplicaciones agronómicas, y en especial su eficacia como correctores de la clorosis férrica, se diseñaron varios ensayos vegetales.

Inicialmente, se estudió el efecto sobre la nutrición férrica en cítricos y en melocotoneros, cultivos sensibles a este micronutriente y de importancia económica dentro de la Unión Europea. En sus zonas de cultivo son frecuentes las deficiencias de hierro debido al alto contenido de caliza en suelos. Con relación a la experimentación en cítricos, se realizaron dos ensayos uno de invernadero y otro de campo. Este último se efectuó en Valencia y con una duración de dos años. Durante el primer año del ensayo de campo se realizó simultáneamente el ensayo de invernadero en condiciones controladas. El objetivo era evaluar la eficacia de los productos sobre plantas de menor edad, cultivadas en el mismo suelo que el cultivo de campo de Valencia. El ensayo sobre melocotoneros se desarrolló durante un año en la provincia de Lleida.

Se ejecutó un segundo ensayo vegetal sobre plantas hortícolas en invernaderos comerciales con dos objetivos, más orientados al estudio de la capacidad del Aquamato férrico como sustrato que como corrector de micronutrientes. El primer objetivo fue evaluar la incidencia de una mezcla Aquamato férrico con otro sustrato orgánico sobre la germinación y posterior desarrollo de plántulas de tomate y pimiento, mientras que en el

## VI Validación agronómica de los productos

segundo objetivo se pretendía determinar la influencia de una mezcla de Aquamato férrico con el sustrato orgánico en el enarenado sobre la producción y desarrollo de plantas de pepino.

Por último, se diseñó un fertilizante líquido para ser utilizado en fertirrigación, comprobándose su eficacia sobre plantas de tomate en invernadero de investigación.

## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1. Evaluación sobre cítricos

#### 1.1.1 Ensayo de invernadero

##### 1.1.1.1 Material vegetal

Se ensayaron dos variedades en el invernadero: *Citrus Unshiu* Ten. var. Satsuma Owari y *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Navel Lane Late ambas sobre portainjerto carrizo.

La variedad Satsuma es de origen desconocido y apareció por primera vez en Japón, donde constituye la mayor parte de las plantaciones de agrios. El árbol es vigoroso y de mediano desarrollo, distinguiéndose por su resistencia al frío. El fruto tiene buen tamaño, carece de semillas y su contenido en zumo es elevado aunque de escasa calidad (Loussert, 1992). En el Mediterráneo sólo se produce en España con las que se inicia las campañas de exportación, si bien coincide con la maduración de clones precoces de clementina que dan frutos de calidad organoléptica superior.

La variedad Lane Late es de origen australiano. El árbol presenta menos espinosidad que otras variedades tardías del grupo Navel. El fruto es de forma redondeada y con el ombligo poco visible exteriormente. Sus características organolépticas son buenas y el zumo, de sabor dulce y agradable, produce una baja proporción de limonina. Esta variedad es de maduración tardía, y el fruto se conserva bien en el árbol, incluso hasta finales de



## VI Validación agronómica de los productos

junio, sin perder su calidad organoléptica. Su productividad puede considerarse normal y puede ser una variedad interesante para prolongar el período de recolección del grupo de variedades Navel.

El citrange carrizo es un híbrido del *Poncirus trifoliata* y *Citrus Sinensis* (naranja Washington Navel), cuya principal característica es su buena tolerancia a la tristeza. Además conviene destacar su resistencia al frío y a la gomosis producida por *Phytophthora*; el crecimiento y vigor de los plántones en vivero, superiores a los observados para el naranja amargo; así como la productividad y calidad de sus frutos. Por desgracia también presenta defectos entre los que se encuentran su escasa sensibilidad a los cloruros y caliza del suelo, que aprovechamos en este trabajo; así como a los excesos de humedad en terrenos pesados (Loussert, 1992).

### *1.1.1.2 Desarrollo experimental.*

#### *A) Ubicación*

El experimento biológico se llevó a cabo en un invernadero de investigación semiautomatizado modelo Hiberlux cuya superficie total cubierta es de 260 m<sup>2</sup>, y que se encuentra dividido en cuatro cámaras independientes, una de las cuales fue utilizada para nuestro ensayo. Está situado en el Campus de la U.A.M., orientado según el eje Este-Oeste y dotado de un sistema de calefacción eléctrica y de una instalación de refrigeración tipo Cooling System.

#### *B) Condiciones Ambientales*

La duración y periodo anual en el que se desarrolló el experimento hizo que los intervalos obtenidos, tanto para la temperatura como para la humedad fueran amplios, oscilando para los distintos meses entre los siguientes valores:

Temperatura diurna: 20 °C- 30 °C

Temperatura nocturna: 7 °C- 15 °C

## VI Validación agronómica de los productos

Humedad relativa: 50%-60%

### *C) Cultivo*

El cultivo en suelo se realizó en tiestos con 18 litros de capacidad, que contenían 2 litros de arena de cuarzo en el fondo, con el fin de mejorar el drenaje, y el resto de su capacidad fue completada con una mezcla al 50% de perlita (Comercial Projar S.A., Valencia) y suelo procedente de Bétera (Valencia), cuyas características fisicoquímicas se recogen en la Tabla 6 (ver capítulo III, 1.4.2 Suelos agrícolas. Caracterización)

Se utilizaron plántones de las dos variedades enunciadas, procedentes de los Viveros Valencia (Peñíscola, Castellón). Aquellos fueron transplantados a los tiestos el 2 de Marzo de 1994, y los tratamientos comenzaron el 12 de Abril del mismo año.

Los tiestos fueron dispuestos en 4 bloques al azar. Cada bloque consistía en seis tratamientos para cada variedad, es decir, 12 tiestos por bloque. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

1. Control no tratado con fertilizante férrico.
2. Fe-EDDHA: con adición de 20 g de Sequestrene-138 (Ciba Geigy)(1,2 g de Fe) por árbol, en forma sólida y aplicado en dos agujeros efectuados en la zona radicular.
3. Dosis normal de Aquamato férrico: 130 gramos de producto (23,5 g de Fe) por árbol, en forma sólida y aplicados en dos agujeros efectuados en la zona radicular.
4. Dosis doble de Aquamato férrico: 260 gramos de producto (47 g de Fe) por árbol, en forma sólida y aplicados en dos agujeros efectuados en la zona radicular.
5. Dosis normal de Doliron: 126 gramos de producto (65 g de Fe) por árbol, en forma sólida y aplicados en dos agujeros efectuados en la zona radicular.
6. Dosis doble de Doliron: 253 gramos de producto (13 de Fe) por árbol, en forma sólida y aplicados en dos agujeros efectuados en la zona radicular.

De forma adicional a estos tratamientos, también se realizó una fertilización con 100.

## VI Validación agronómica de los productos

ml por tiesto de una disolución que contenía:  $\text{KNO}_3$  (2 mM),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (5 mM) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 mM). Esta fertilización se realizó cada quince días durante todo el periodo que duró el experimento.

Las plantas del cultivo se regaron mediante riego localizado de forma periódica según la época del año. En los meses de marzo a junio, cada dos semanas se alternaba con tres riegos semanales de 45 minutos y dos riegos la semana siguiente de otros 45 minutos. De Julio a final de Agosto los ciclos eran de dos semanas regando 45 minutos cada dos días. De Septiembre hasta finales del ensayo, los riegos coincidían con los de marzo y junio. El 13 de Septiembre de 1994 se aplicó un fitotóxico contra la araña roja a todos los árboles del ensayo.

### *D) Muestreos foliares*

A lo largo del experimento se realizaron tres tomas de muestra que coincidieron con los momentos fenológicos de floración, formación de fruto y maduración de éste, si bien en nuestros árboles no se dio esta fenología debido a que fueron desflorados para evitar la fructificación. Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas:

1ª Toma de muestra: 24 de Junio de 1994 (73 días)

2º Toma de muestra: 1 de Agosto de 1994 (111 días)

3ª Toma de muestra: 13 de Octubre de 1994 (184 días)

La toma de muestra se realizó según el método de Chapman (1960). Debido a la juventud de los árboles, el número de brotes y hojas no era muy elevado. Por este motivo se tomaron tres hojas de cada brote respetando la misma edad y en todas las direcciones. De esta forma se obtuvo un número suficiente de hojas homogéneas para garantizar el análisis mineral.

El material vegetal se llevó al laboratorio donde se trataron y analizaron macro y microelementos, según se describe en el apartado 1.5 de este capítulo, punto 1.5.3.1 "Determinación por Absorción atómica"

## VI Validación agronómica de los productos

### 1.1.2 Ensayo de campo

#### 1.1.2.1. Material vegetal

La variedad escogida para el ensayo de campo fue *Navelina* injertada sobre patrón amargo. Esta variedad ha alcanzado cierta importancia en el curso de las últimas décadas, sobre todo en España. Es un poco más precoz que la Washington; sus frutos son un poco más finos y tiene una epidermis intensamente coloreada.

En general, las naranjas del grupo navel presentan dos características esenciales que diferencian a éstas de otras variedades. La primera es la presencia en el extremo estilar de un pequeño fruto rudimentario denominado Navel; la segunda, que se trata de un grupo de variedades sin semillas, y por tanto de elevado interés comercial. Los frutos de las naranjas Navel son de maduración precoz (se recolectan de Noviembre a Febrero), de excelente calidad organoléptica, con pulpa crujiente y fáciles de comer. Existen en el seno de este grupo distintas variedades, originadas por mutación natural y posteriormente reproducidas, reconociéndose como el origen de la mayoría de ellas a la variedad Washington. Las naranjas Navel se adaptan mal a los climas calurosos de las regiones tropicales y subtropicales ya que en estas condiciones sus frutos carecen de coloración y de acidez. Las grandes regiones de cultivo son California, Brasil, Sudáfrica, Australia, España y Marruecos.

Hasta 1956 el naranjo amargo representaba entre el 90 y el 95% del total de naranjos plantados en la región Mediterránea. Este alto porcentaje se debe a las excelentes cualidades del mismo, entre las que destacan la afinidad de injertos para adaptarse a numerosos tipos de suelo, su resistencia satisfactoria a la caliza, su buena tolerancia a la clorosis, su fácil multiplicación por semilla, así como una gran afinidad con la mayor parte de las especies cultivadas. Sin embargo, la sensibilidad a la tristeza de la asociación Citrus/Naranjo amargo, salvo para el limonero, obliga a los países productores del Mediterráneo a poner en práctica la sustitución por otros porta injertos.

## VI Validación agronómica de los productos

### *1.1.2.2. Desarrollo experimental*

#### *A) Ubicación*

El ensayo de campo se realizó en una finca localizada en el término municipal de Bétera, provincia de Valencia, sobre árboles de 15 años de edad. Esta finca fue seleccionada por el Dr. Francisco Legaz (I.V.I.A.), en atención a su alta homogeneidad y control periódico de la misma, como puede verse en los resultados mostrados en la tabla 26. En esta tabla se muestra el análisis foliar de los cítricos durante los dos años previos a este ensayo y en las tres parcelas que comprenden la finca. En nuestro ensayo utilizamos las parcelas 2 y 3, cuyo suelo es el indicado en la tabla 6 (ver cap. III punto 1.4.2. "Suelos de uso agrícola. Caracterización") y que además fue el utilizado en la experiencia de invernadero.

**Tabla 26** Estado nutricional de los árboles en los dos años previos al ensayo (Datos proporcionados por Dr Francisco Legaz. I.V.I.A.)

Parcela	1992		1993	
	2	3	2	3
Ca (%)	7,53	8,06	4,85	4,56
Mg (%)	0,241	0,235	0,213	0,208
K (%)	1,35	1,22	1,23	1,34
P (%)	0,158	0,151	0,123	0,134
N (%)	2,42	2,47	2,37	2,36
Fe (ppm)	53,6	64,3	74,1	77,4
Mn (ppm)	37,8	57,5	13	13,4
Cu (ppm)	6,8	7,5	7,6	8,3
Zn (ppm)	51,4	68,6	*406	*408

\*Los valores altos de Zn denotan los tratamientos foliares efectuados con ese elemento

#### *B) Diseño experimental*

El diseño experimental consistió en seis tratamientos con cuatro repeticiones dispuestos en cuatro bloques al azar, como puede apreciarse en el esquema del ensayo

## VI Validación agronómica de los productos

recogido en la figura 42. Cada tratamiento presentaba 12 árboles, en dos filas enfrentadas de seis árboles cada uno, separados por un árbol borde entre filas y alrededor de ellos una fila borde.

### *C) Tratamientos*

Los tratamientos se describen a continuación:

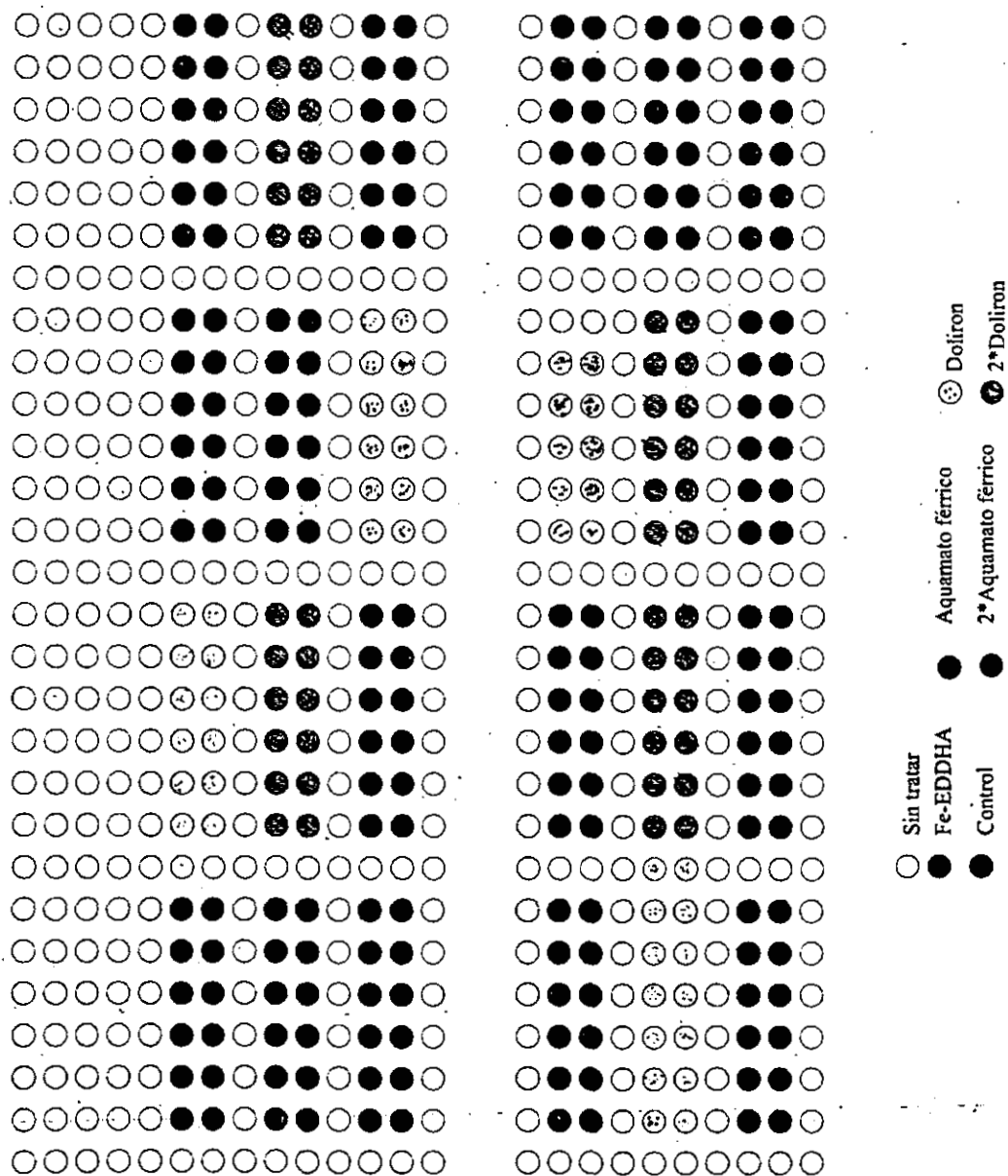
1. Control no tratado con fertilizante férrico.
2. Fe-EDDHA (Sequestrene-138 de Ciba Geigy): 50 g de producto sólido total por árbol (3 g Fe).
3. Dosis normal de Aquamato férrico: 429 g de producto sólido total por árbol (77 g Fe).
4. Dosis doble de Aquamato férrico: 858 gramos de producto sólido total por árbol (154 g Fe).
5. Dosis normal de Doliron: 337 gramos de producto sólido total por árbol (17,2 g Fe).
6. Dosis doble de Doliron: 674 gramos de producto sólido total por árbol (34,4 g Fe).

El ensayo de campo se realizó durante dos años consecutivos. Los tratamientos ensayados fueron los mismos en este periodo de tiempo, aplicándose las mismas dosis de productos a los mismos árboles y de la misma manera. Los productos se aplicaron por árbol, a ambos lados de la fila, media dosis por lado y, además se adicionó media dosis en cada árbol borde.

### *D) Muestreos foliares*

El primer año de ensayo, temporada 94/95, los tratamientos empezaron el 16 de Marzo de 1994 (día 0). Se realizaron cuatro tomas de muestra correspondientes a los estados fenológicos de la planta.

**Figura 42** Esquema del ensayo de campo sobre *Citrus* vr. Navelina realizado en Bétera (Valencia)



## VI Validación agronómica de los productos

1ª Toma de muestra: 16 de Abril de 1994 (floración, 31 días)

2ª Toma de muestra: 10 de Junio de 1994 (formación de fruto, 83 días)

3ª Toma de muestra: 25 de Julio de 1994 (engorde de fruto, 118 días)

4ª Toma de muestra: 21 de Noviembre de 1994 (maduración, 206 días).

El segundo año los tratamientos empezaron el 1 de Abril de 1995 (día 0). Se realizaron dos tomas de muestra:

1ª Toma de muestra: 18 de Mayo de 1995 (floración, 48 días)

2ª Toma de muestra: 26 de Septiembre de 1995 (fructificación, 179 días)

En los dos años que duró el ensayo, se realizó una fertilización adicional en la primera quincena de Mayo, consistente en la aplicación foliar de  $MnSO_4$ ,  $ZnSO_4$  y urea. Los riegos se efectuaron por inundación, según el método tradicional de la región de Valencia.

Se muestrearon los ocho árboles centrales, tomándose seis hojas por cada árbol en orientación de sextete. Se escogió la cuarta hoja completamente desarrollada correspondiente al brote de primavera y que no presentara flores, ni frutos, ni alteraciones producidas por plagas o enfermedades.

En el segundo año del ensayo, algunos árboles mostraban signos de virosis, especialmente en la segunda toma de muestra. Por esta razón, se tomaron diez hojas de cada uno de los árboles sanos, de acuerdo con el criterio anteriormente enunciado. No se muestreó ningún árbol que presentara síntomas de Tristeza.

Las hojas muestreadas se mantuvieron en frío y se llevaron al laboratorio para ser posteriormente analizadas según los métodos descritos en el apartado 1.5 de este capítulo, "Tratamiento del material vegetal".

### *E) Muestreo de fruto*

Sólo se realizó recuento de fruto el primer año de ensayo, debido a que en el



## VI Validación agronómica de los productos

segundo año la cosecha se vio afectada por la virosis. La recogida se inició el 17 de Enero de 1995, controlándose el rendimiento producido por cada uno de los árboles muestreados en los análisis foliares.

También se tomaron 10 frutos, elegidos al azar en cada uno de los árboles muestreados para determinar los parámetros de calidad en la producción de cítricos: peso y calibre de fruto, pH, acidez valorable, grados Brix y ácido ascórbico en zumo, según las metodologías que se indican en el apartado de este capítulo, apartado 1.5.4. "Análisis de fruto".

### **1.2. Evaluación sobre melocotoneros**

#### **1.2.1. Material vegetal**

Con el nombre de *Sudanell*, también llamado en algunos lugares "amarillo de agosto", se designa a una variedad de melocotón local, obtenida de cruces sucesivos en la localidad que lleva su mismo nombre en la provincia de Lleida. Su genealogía es desconocida, siendo su denominación la correspondiente a una variedad población, con características que son completamente homogéneas (Casero, 1985).

El árbol es de un vigor elevado, con porte abierto y levantado. Se injerta normalmente sobre pie franco, poseyendo una raíz vertical gruesa y poco profunda, juntamente con otras que se extienden horizontalmente en gran longitud. El portainjerto franco presenta buena afinidad y confiere a los árboles injertados sobre este patrón un gran vigor y rápido crecimiento.

La época de la floración de esta variedad es intermedia, produciéndose cuando ascienden las temperaturas durante el final del invierno (Cambra, 1979), hecho que tiene lugar normalmente en la segunda quincena del mes de marzo.

El fruto constituye una drupa de tamaño medio, sensiblemente esférica, con sección transversal y longitudinal de forma circular. Presenta una hendidura longitudinal que va

## *VI Validación agronómica de los productos*

desde la inserción del pedúnculo hasta el ápice del fruto, dividiéndole en dos partes, con la cavidad peduncular medianamente profunda. La piel escasamente vellosa, es de coloración amarilla, con esfumadera carmín o purpurina, pero solamente en la parte expuesta al sol, siendo de un espesor delgado y adherida a la pulpa.

Su grado de productividad es bueno, siendo necesario el aclareo para la obtención de frutos mayores y con mejores valoraciones económicas. Los frutos presentan buena resistencia a la manipulación y al transporte, estando bien considerados en el mercado y poseyendo óptimas aptitudes conserveras.

La pulpa, a su vez, está adherida al hueso, es de color amarillo vivo, sin restos de coloración roja junto al hueso y posee una buena consistencia que le confiere resistencia a la manipulación y al transporte.

### **1.2.2. Desarrollo experimental**

#### *1.2.2.1. Ubicación*

El ensayo fue realizado en un campo de melocotoneros sito en el término municipal de Sudanell, provincia de Lleida. Los árboles tenían 12 años. La finca fue elegida por el Dr. Tomás Casero (E. T. S. de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Lleida), en base a la elevada producción y calidad de fruto tradicionalmente registrados en esa zona. Las características del suelo vienen dadas en la tabla 27.

#### *1.2.2.2 Diseño experimental*

El diseño experimental constaba de seis tratamientos dispuestos en cuatro bloques al azar. Cada tratamiento consistió en cinco árboles útiles separados por un árbol borde. En la figura 43 se recoge un esquema del ensayo. Éste se realizó junto con el estudio de otro tipo de productos, por lo que en dicha figura los árboles presentados en blanco no se consideran a efectos de esta memoria.

## VI Validación agronómica de los productos

**Tabla 27** Características del suelo de Sudanell (Lleida)

Textura	
Arena (diámetro de partícula 2,00-0,02 mm)%	46
Limo (diámetro de partícula 0,02-0,002 mm)%	28
Arcilla (diámetro de partícula <0,002 mm)%	26
Textura Clasificación Internacional	Franco arcillo arenoso
pH (saturación suelo/agua)	7,82
pH (saturación, suelo/KCl)	7,23
Conductividad eléctrica extracto 1:5 ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	188
Caliza total %	17,9
Caliza activa %	5,2
Nitrógeno Kjeldahl %	0,14
M.O. Oxidable	2,37
C/N	9,82
Macronutrientes (Extracto Soltanpour, $\text{cmol}\cdot\text{Kg}^{-1}$ )	
K	1,02
Na	0,048
Ca	1,55
Mg	0,67
P ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ )	27,4
Micronutrientes (Extracto Soltanpour, $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ )	
Fe	26,7
Mn	5,83
Cu	47,1
Zn	4,57

### *1.2.2.3: Aplicación de los productos*

Los tratamientos se enumeran a continuación:

1. Control: no tratado con fertilizante férrico.
2. Fe-EDDHA (Sequestrene-138 G-100 de Ciba Geigy): 50 gramos de producto sólido total por árbol (3 g de Fe).
3. Dosis normal de Aquamato férrico: 426 gramos de producto sólido total por árbol (75 g Fe).

## ***VI Validación agronómica de los productos***

**Figura 43** Diseño experimental del ensayo sobre melocotoneros en Sudaneli (Ileida)

## VI Validación agronómica de los productos

4. Dosis doble de Aquamato férrico: 825 gramos de producto sólido total por árbol (150 g Fe).
5. Dosis normal de Doliron: 937 gramos de producto sólido total por árbol (75 g Fe).
6. Dosis doble de Doliron: 1875 gramos de producto sólido total por árbol (150 g Fe).

La aplicación de los productos se realizó de forma similar a la descrita en el ensayo de campo sobre cítricos en Bétera (Valencia). Se aplicó a cada árbol y por ambos lados de la fila, media dosis por lado, adicionando además media dosis en cada árbol borde.

### *1.2.2.4. Muestreos foliares*

El ensayo se efectuó en la temporada de 1995, iniciándose los tratamientos el día 31 de Mayo (día 0). Realizándose dos tomas de muestra:

1ª Toma de muestra: 16 de Mayo de 1995 (día 45, formación de fruto)

2ª Toma de muestra: 20 de Junio de 1995 (día 110, maduración del fruto)

Se muestrearon los cinco árboles correspondientes a cada tratamiento, tomándose 12 hojas por árbol. Se escogió la cuarta hoja completamente desarrollada, sin que presentara flores ni fruto, ni tampoco alteraciones producidas por plagas o enfermedades.

Las hojas muestreadas se mantuvieron en frío y se llevaron al laboratorio para ser posteriormente analizadas, de acuerdo con los métodos descritos en el punto 1.5 "Tratamiento del material vegetal" de este apartado de "Materiales y Métodos".

### *1.2.2.5. Muestreo de frutos*

La recogida del melocotón se inició el día 10 de Agosto de 1995 controlándose el rendimiento producido por cada árbol que había sido muestreado anteriormente. También se tomaron 10 frutos al azar de cada uno ellos para evaluar la calidad del fruto.

### 1.3. Evaluación sobre hortalizas

#### 1.3.1. Material vegetal

##### 1.3.1.1. Características del pimiento

El pimiento pertenece a la familia *Solanaceae*, y su nombre científico es el de *Capsicum annuum* L.

Es una planta herbácea cuyo sistema radicular pivotante y profundo puede llegar hasta 70-120 cm, provisto y reforzado de un número elevado de raíces adventicias. El tallo es de crecimiento limitado y erecto, con un porte medio que puede variar entre 0,5 y 1,5 cm. Cuando la planta adquiere una cierta edad los tallos se lignifican ligeramente. Las hojas son lampiñas, enteras, ovales o lanceoladas con un ápice muy pronunciado (acuminado) y un peciolo largo o poco aparente (Bailey, 1977).

Las flores poseen la corona blanquecina, aparecen solitarias en cada nudo y son de inserción aparentemente axilar. El fruto es una baya semicartilaginosa y deprimida, de color rojo o amarillo cuando está maduro, que se puede insertar pendular o enhistamente, de forma y tamaño muy variable. En este último aspecto puede decirse que existen variedades que dan frutos de 1 ó 2 gramos, frente a otras que pueden formar bayas de más de 300 gramos.

Las semillas, redondeadas y ligeramente reniformes, suelen tener 3-5 mm de longitud, se insertan sobre una placenta cónica de disposición central y son de color amarillo pálido. En 1 gramo pueden contenerse entre 150 y 200 semillas y su poder de germinación dura de 3 a 4 años.

##### 1.3.1.2. Características del tomate

El cultivo del tomate fue introducido en Europa después del descubrimiento de América, aunque su cultivo como planta de interés agrícola se inició alrededor de 1800.

## VI Validación agronómica de los productos

De acuerdo con Tabares (1977) el tomate es una planta herbácea anual, de raíz pivotante o fasciculada que en algunos casos puede presentar una forma intermedia entre ambas. El tallo es leñoso y terminado en una inflorescencia o ramo estéril. A través de éste salen una serie de hojas y racimos. De las axilas de las hojas aparecen los renuevos o hijos, formando éstos a su vez hojas y racimos. Las hojas son compuestas, al estar formadas por 7-9 hojas sencillas, las cuales se disponen alternativamente sobre el tallo.

Las flores se presentan en racimos simples o bifurcados. El tipo simple se puede localizar en la parte más baja de la planta, mientras que el ramificado en la más alta. En caso de no producirse la fecundación las flores caen.

El fruto tiene forma de baya y consta de piel, pulpa, placenta y semillas. El periodo aproximado de cuajado y maduración de los frutos es aproximadamente de 45 días, desde el comienzo de la floración, aunque ello depende de la variedad utilizada. El tamaño y forma de los frutos es característico de cada variedad, dependiendo su uso final de las características organolépticas, así como de su idoneidad para el almacenamiento.

Las semillas son de forma oval, aplastadas lateralmente, de color amarillo grisáceo y cubiertas con pelos grises. El tamaño de las mismas también depende de la variedad de tomate, pero puede considerarse que un gramo de semilla puede contener entre 200 y 300.

La variedad *Royesta* (Royal Sluis F1), utilizada en este ensayo, está considerada como de verano. Los frutos son redondeados, lisos y blancos en la zona peduncular; siendo utilizados para su consumo en fresco. La planta tiene alto vigor, con una producción neta de 11,4 Kg·m<sup>-2</sup> considerada elevada (Tabares y Álamo, 1992).

### *1.3.1.3. Características del pepino*

El pepino es un cultivo relativamente exigente que requiere suelos preferentemente francos, profundos y permeables, con un buen nivel de materia orgánica, respondiendo muy bien a la aplicación de estiércol. La reacción del suelo puede variar ampliamente, aunque lo más apropiado es que sea ligeramente ácido. El fósforo es el elemento más crítico cuando

## VI Validación agronómica de los productos

escasea, siendo su deficiencia la de mayor repercusión práctica al incidir de modo notable sobre la calidad del fruto.

El pepino "*Cucumis sativus*" pertenece a la familia de las Cucurbitáceas, es de ciclo anual y originario de la India. El tallo es herbáceo, vellosos, rastrero o trepador y provisto de zarcillos más o menos largos. El aparato radicular se presenta poco desarrollado y localizado, sobre todo en la superficie. Las hojas son alternas, pecioladas, grandes y palmadas. Por su parte, las flores son pentámeras, tetracíclicas, actinomorfas y unisexuales, con un androceo y estambres en número igual a los pétalos. El fruto es baciforme, de gran tamaño, aunque sus dimensiones varíen según las variedades. La pulpa es carnosa, blanco-verdosa y presenta en la parte central numerosas semillas (Gola y col, 1965).

### **1.3.2. Desarrollo experimental**

El trabajo de campo de este ensayo fue realizado por el personal técnico de los invernaderos de "Cuatro Vientos" y del "Departamento de Biología General, Producción Vegetal y Ecología de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Almería", bajo la coordinación del Dr. Juan Luis Valenzuela.

#### *1.3.2.1 Ubicación*

Los ensayos vegetales sobre hortalizas se efectuaron en invernaderos comerciales normalmente dedicados a la producción de plántulas y situados en el paraje de "Cuatro Vientos", El Ejido, provincia de Almería.

Las plantas crecieron en un invernadero de los llamados tipo "Parral" o tienda de campaña. Estos invernaderos se construyen a base de rollizos de madera con los pies derechos y alambre galvanizado en las cubiertas. La anchura del invernadero fue de 20 m, con una superficie de 2000 m<sup>2</sup>, con una cubierta de polietileno térmico de 800 galgas. El invernadero, con orientación Este-Oeste, presentaba un sistema de fertirrigación localizado, con goteros de largo recorrido "inter-lineal" y un caudal de 4 L/h. Este invernadero, y con estas características, es el más utilizado en Almería (Lamrani, 1995).



## VI Validación agronómica de los productos

### *1.3.2.2. Experimento con pimienta.*

El objetivo del presente ensayo era evaluar la eficacia del Aquamato férrico sobre la germinación y desarrollo de las plántulas de pimienta, cuando se mezclaba con el sustrato que tradicionalmente es usado en semilleros comerciales.

Para ello se utilizaron semillas de pimienta italiano variedad Peto 888 que fueron plantadas sobre bateas de poliestireno expandido. Cada batea presentaba 150 alvéolos, en cada uno de los cuales se colocó una semilla.

El sustrato denominado control era una mezcla de fibra de coco y turba, en una proporción de volumen del 40% del primer componente y 60% del segundo. Asimismo la turba también se encontraba mezclada, un 20% de turba negra y 40% de turba rubia. Tres dosis del Aquamato férrico fueron mezcladas en el semillero con este sustrato control. Los tratamientos ensayados fueron, en volumen:

- a) Control, sustrato sin tratar.
- b) Tratamiento 90:10; 90% de sustrato control y 10% de Aquamato férrico.
- c) Tratamiento 75:25; 75% de sustrato control y 25% de Aquamato férrico.
- d) Tratamiento 50:50; 50% de sustrato control y 50% de Aquamato férrico.

Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento, iniciándose el ensayo el 19 de agosto de 1996. Para constatar la influencia de los tratamientos sobre la germinación y posterior desarrollo de las plántulas se evaluó el número de plántulas desarrolladas a los 15, 23 y 27 días desde el inicio de los tratamientos. A los 15 días de tratamiento se tomó también en consideración la altura de las plántulas desarrolladas; aquellas que mostraban una altura superior a 6 cm y las que presentaban la primera hoja verdadera con desarrollo menor de 1 cm de altura.

Cuando las plantas se presentaron suficientemente desarrolladas se determinó el índice SPAD para cada tratamiento. En total se realizaron 8 muestreos a los 23, 27, 30, 35, 38, 41, 45 y 49 días desde el inicio de los tratamientos y en cada uno de ellos se ejecutaron

## VI Validación agronómica de los productos

15 medidas por cada repetición. También se midieron pigmentos fotosintéticos, en concreto clorofilas a y b y carotenos, en dos muestreos a los 35 y 45 días de tratamiento.

Con el objetivo de conocer el efecto de éstos sobre el peso fresco y el peso seco, se efectuaron cinco muestreos a los 35, 38, 41, 45 y 49 días desde su inicio. En los días 35, 41, 45 y 49, se realizó además el análisis mineral de las muestras. En todos los muestreos se estimó tanto la longitud de la parte aérea, como de la radicular. A continuación se separaron y pesaron hojas, raíces y tallos, para proceder al pretratamiento del material vegetal y al análisis mineral, siguiendo el método descrito en el apartado 1.5 "Tratamiento del material vegetal" de este capítulo.

### *1.3.2.3. Experimento con tomate*

El objetivo de este ensayo, análogo al descrito para el pimiento, era igualmente evaluar, la eficacia del Aquamato férrico sobre la germinación y desarrollo de plántulas de tomate.

Las semillas de tomate cv. *Royesta* se plantaron en bateas de poliestireno expandido con 250 alveolos, considerando que debía germinar una semilla por alveolo. Se ensayaron tres dosis de este producto mezclado con un sustrato control en el semillero.

Los tratamientos, en volumen, se enumeran a continuación;

- a) Control, sustrato sin tratar (40% de fibra de coco y 60% de turba).
- b) Tratamiento 95:5; 95% de sustrato control y 5% de Aquamato férrico.
- c) Tratamiento 90:10; 90% de sustrato control y 10% de Aquamato férrico.
- d) Tratamiento 85:15; 85% de sustrato control y 15% de Aquamato férrico.

Fueron realizadas cuatro repeticiones por tratamiento, iniciándose una primera experiencia el 25 de septiembre de 1996. A los 36 días las plantas se estropearon, por lo que fue necesario emprender una segunda que comenzó el 26 de diciembre de 1996 y que afortunadamente pudo llevarse a término.

## VI Validación agronómica de los productos

Como parámetro valorado para constatar el efecto de los tratamientos sobre la germinación de plántulas de tomate se incluyó el número de plantas a los 26 días del inicio de los tratamientos. De forma análoga a la experiencia de pimiento, se determinó el índice SPAD de las hojas de tomate a través de siete muestreos, realizados a los 26, 29, 32, 35, 39, 43 y 46 días de tratamiento. Para terminar, se tomaron muestras de planta a los 32, 35 y 46 días del inicio de los tratamientos. En cada uno de ellos, la parte aérea fue separada de la radicular para ser a continuación medidas, pesadas y efectuar su análisis mineral, bien con lo descrito en el apartado 1.5 de este capítulo.

### *1.3.2.4 Experimento con pepino.*

Esta experiencia se realizó con plantas de pepino cv *Alaska*, incorporándose estiércol de oveja mezclada con Aquamato férrico en la capa orgánica del enarenado durante el retranqueo. El experimento fue constituido conforme a un diseño de bloques al azar con un total de tres bloques y tres tratamientos por bloque. A su vez, cada bloque estaba formado por 9 filas de plantas, y cada tratamiento presentaba una fila de 10 de plantas en la cual se muestreaban las ocho centrales.

Los tratamientos fueron;

- a) Tratamiento control, el sustrato actualmente usado en retranqueo, 2 Kg de estiércol·m<sup>-2</sup>
- b) Tratamiento E+125: 1 Kg de estiércol más 125 gramos de Aquamato férrico·m<sup>-2</sup>
- c) Tratamiento E +250: 250 gramos de Aquamato férrico·m<sup>-2</sup>

Las plantas se cultivaron 30 días antes de incorporar el estiércol y pasado este tiempo, en concreto el 9 de septiembre de 1996, se agregó el estiércol directamente al suelo. En ese momento las plantas presentaban una altura de entre 25-30 cm. Se midió el índice SPAD y el contenido en clorofilas a, b y carotenos, a los 7, 28, 49 70 y 91 días después del inicio de los tratamientos. Al mismo tiempo, se realizaron dos tomas de muestra, a los 49 y 91 días para efectuar el análisis mineral de las hojas y evaluar el peso fresco y seco.

## **VI Validación agronómica de los productos**

También se realizaron 18 cuenteos para conocer el rendimiento de fruto producido por las plantas muestreadas (23, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63, 66, 71, 77, 84, 91 y 98 días después del inicio de los tratamientos). Por último, se realizó un análisis de calidad de fruto, para el que se midió el contenido de sólidos solubles en grados Brix, así como el pH y la firmeza de la pulpa.

### **1.4 Concentrado líquido como fertilizante férrico foliar.**

En los apartados anteriores se ha aludido a la utilización del Aquamato férrico como fertilizante, bien aplicado directamente al suelo o bien adicionándolo a un sustrato orgánico. Otra de las opciones estudiadas es la elaboración a partir del Aquamato férrico de un producto líquido, apto para uso foliar y en fertirrigación. Esta forma de aplicación - mediante su solubilización en agua- resulta posible gracias a las características de solubilidad de las sales alcalinas de un metal con los ácidos húmicos con un metal.

Uno de los métodos comúnmente utilizado para la obtención de concentrados a partir de ácidos húmicos ha sido el tratamiento de leonardita con ácido fosfórico e hidróxido amónico (Karcher, U.S. patent Nos. 3,111,404, 3,264,084 y 3,544,295), utilizado para extraer el ácido húmico de la leonardita. Cualquier método que utilice la sal líquida alcalina de un ácido húmico con un metal, en combinación con aditivos que incrementen sinérgicamente el efecto del humato, potenciaría el uso de los humatos líquidos en zonas agrícolas. Preferiblemente, se utilizaría un humato líquido, económico y fácil de fabricar, capaz de afectar positivamente el rendimiento de un cultivo, tanto en relación con el número de frutos por planta como respecto del tamaño de cada unidad.

De acuerdo con estas consideraciones, se extrajo a partir del Aquamato férrico un fertilizante líquido. Se realizó mediante su extracción alcalina con KOH 3M y estabilización del Fe con ácido cítrico, obteniéndose un concentrado que presentaba un porcentaje de materia orgánica del 10% y de Fe total del 2% (López, 1998). Para evaluar la efectividad del fertilizante, se realizó un ensayo vegetal sobre tomate cultivado en hidroponía de sustrato e invernadero de investigación, que será descrito a continuación.

## VI Validación agronómica de los productos

### **1.4.1 Material vegetal**

El cultivo se realizó con *Licopersicon esculentum* Mill var. Lydia de gran implantación en el sudeste español. Es un híbrido tipo "beefseetk" americano, fácilmente adaptable tanto a invernadero como al aire libre y muy resistente a enfermedades tales como el virus del mosaico, a los hongos *Verticilium*, *Alvoatrum*, *Fusarium*, *Oxocoum* y a plagas de Nematodos Solani *meloidogyne* sp. El fruto es acostillado, de tamaño grueso y peso entre 180 a 250 gramos con lóculos y hombros, de forma achatada (Nuez, 1995).

Las plántulas con 38 días procedían del vivero "La Rosa" situado en Arroyo Molinos (Madrid), garantizando la variedad Lydia.

### **1.4.2 Desarrollo experimental**

Tanto la ubicación como las condiciones medioambientales fueron las mismas que las descritas el apartado 1.1.1.2 de este mismo capítulo para la experimentación sobre cítricos en invernadero.

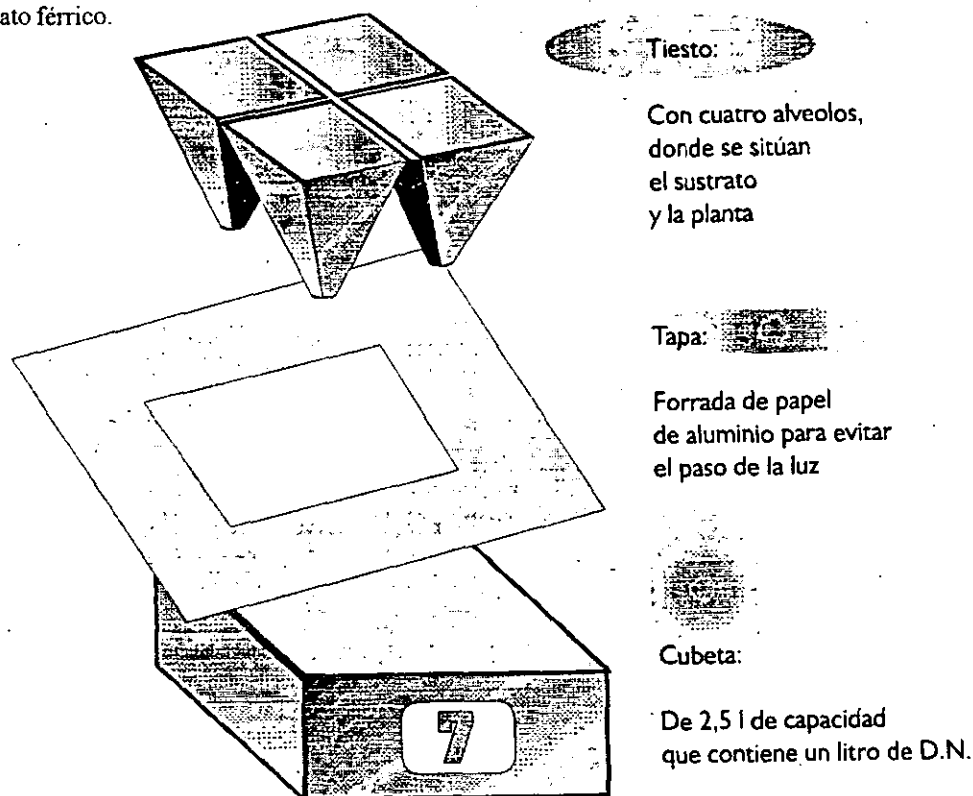
#### *A) Cultivo*

Los tiestos empleados se diseñaron específicamente para la realización de este ensayo. El objetivo era la obtención de un sistema casi hidropónico con ascensión nutritiva por capilaridad y mantener un importante volumen de aire en la perlita, evitando así las cantidades significativas de hierro que pueden proporcionar la utilización de grandes volúmenes de sustrato inerte. El diseño experimental puede verse en la figura 44.

El sistema señalado consiste en una cubeta de dos litros y medio de capacidad, donde se añade la disolución nutritiva, forrada de plástico para evitar el paso de la luz. Cada tiesto fue previamente pintado de negro y constaba de cuatro alvéolos independientes, cada uno de los cuales media 15x15x15 cm. Entre el tiesto y la bandeja se situaba una tapa de papel de aluminio para evitar el paso de la luz a la disolución nutritiva provocando, además, un mayor aporte de insolación al envés de las hojas.

## VI Validación agronómica de los productos

**Figura 44** Esquema de los tiestos utilizados en el ensayo de validación del concentrado líquido procedente del Aquamato férrico.



La disolución nutritiva empleada viene recogida en la tabla 28. Además se añadieron  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Fe como Fe-EDDHA;  $1,20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Mn como  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $0,15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Cu como  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Zn como  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de B como  $\text{H}_3\text{BO}_3$  y  $0,05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Mo como  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

**Tabla 28** Disolución nutritiva utilizada en el ensayo de valoración del fertilizante líquido. Macronutrientes.

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{NO}_3^-$	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{Cl}^-$	$\text{HCO}_3^-$	Totales
$\text{Ca}^{2+}$	9,0					9,0
$\text{K}^+$	3,0	1,5	1,0		1,5	7,0
$\text{Mg}^{2+}$			4,0			4,0
$\text{Na}^+$						0,2
$\text{NH}_4^+$	0,5					0,5
Totales	12,5	1,5	5,0	0,2	1,5	20,7

## VI Validación agronómica de los productos

### *B) Desarrollo experimental*

En cada uno de los cuatro alvéolos que constituían los tiestos descritos en el apartado anterior se dispuso una planta de tomate de 38 días sobre sustrato de perlita, y se adicionó 1 litro de la disolución nutritiva recogida en la tabla 28, exenta de Fe. La solución nutritiva tenía un pH inicial de 6,5 y se añadió también un gramo de  $\text{CaCO}_3$ . Las plantas se sometieron a un periodo de deficiencia de 10 días, al término del cual se aplicaron los siguientes tratamientos.

A) Control con  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Fe como Fe-EDDHA.

B) Tratamiento HCDN-  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Fe procedente del extracto aplicado en disolución nutritiva.

C) Tratamiento HCF-  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Fe procedente del extracto aplicado vía foliar. Para lo cual se prepararon 100 ml de disolución 0,01% de Fe ajustando a pH 7,0, en dos aplicaciones de 10 ml por tiesto en cada cambio de disolución nutritiva. Las aplicaciones del tratamiento foliar se realizaron el primer y tercer día de cambio de la disolución nutritiva, adicionando 1 mg de Fe cada día.

La disolución nutritiva se mantuvo una semana (día 17 desde el inicio del ensayo), al cabo de la cual se cambió, tomándose previamente 5 ml previa adición de 1 ml de HCl 1:1, con el fin de realizar el balance nutricional. Se mantuvieron las plantas en esta nueva disolución nutritiva otros siete días, momento en el cual se ejecutó la primera toma de muestra (32 días desde el inicio del ensayo). Para ello, fueron seleccionadas dos plantas por cada tiesto, midiéndose la longitud de las raíces y del tallo, y procediéndose de acuerdo con lo descrito en el apartado 1.5 de este mismo capítulo.

A continuación se mantuvieron las plantas otras dos semanas en tratamiento, realizándose el cambio de la disolución nutritiva a los siete días (día 39 desde el inicio del ensayo) y finalizando el ensayo a los 46 días desde el inicio del mismo. En esta ocasión se tomaron las dos plantas restantes por cada tratamiento, procediendo en la misma forma que en la primera toma de muestra.

## 1.5. Tratamiento del material vegetal

### 1.5.1. Operaciones previas

Las muestras foliares procedentes de los ensayos vegetales se llevaron al laboratorio, donde fueron contadas y pesadas. A continuación se midió el Índice de color con ayuda de un colorímetro SPAD-502 MINOLTA.

Los valores medidos por este aparato corresponden a la cantidad de clorofila presente en hoja, y son calculados en función de la cantidad de luz transmitida por la hoja a dos longitudes de onda en la cual la absorción de clorofilas es diferente. El espectro de absorción de clorofilas muestra picos de absorción en las zonas azul y roja, baja absorción en la región verde y casi no absorbe en el infrarrojo. El intervalo elegido para la medida de Índice SPAD comprende la zona roja del espectro, donde la absorción es elevada y no se ve afectada por el contenido en carotenos, y en la zona del infrarrojo en la cual la absorción es extremadamente baja.

A continuación todas las hojas muestreadas se pesaron y se midió su área foliar en  $\text{cm}^2$  con un medidor de área foliar "Automatic Area Meter modelo AAM-7 Hayashi Denko Co Ltd.". A partir de estos datos se obtuvo el Índice de área foliar (L.A.I.) para cada hoja ( $\text{g p.f.} \cdot \text{cm}^{-2}$ ).

Una vez determinado el índice SPAD y el índice de área foliar, las hojas se lavaron con HCl 0,1M y detergente Tween 80 (1%) durante 20 segundos para quitar el polvo y las partículas de suciedad que no eran visibles. Inmediatamente después se procedió a un lavado con agua en abundancia, aclarándose, por último, dos veces con agua desionizada (Sonnenveld y Van Dijk, 1982).

Las muestras se secaron sobre papel de filtro y se dispusieron en bandejas del mismo material, introduciéndose en una estufa con circulación de aire, a 65-70 °C, hasta peso constante. Una vez secas, se pesaron de nuevo y se redujeron a polvo en un molinillo con aspas de acero inoxidable, guardándose en bolsas de plástico para su posterior análisis.



### **1.5.2 Mineralización**

Las muestras molidas se sometieron a una mineralización vía seca según describe Gárate y col. (1984), para lo cual se pesaron 0,2500 g del tejido vegetal molido en crisoles de porcelana, que fueron introducidos en un horno mufla según el siguiente esquema de calefacción: aumento de la temperatura desde temperatura ambiente hasta 380 °C, subiéndola cada 30 minutos durante dos horas, a continuación aumento hasta 480 °C, manteniéndola constante durante otras dos horas. Pasado este tiempo, se apagó la mufla y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Al material calcinado contenido en los crisoles se le añadieron, por este orden, 1 ml de HCl (Reactivo análisis) 1:1 (v/v) y 5 ml de agua desionizada. Previamente tapados con un vidrio de reloj, los crisoles se dispusieron en una plancha eléctrica a 75 °C, durante 30 minutos. El digerido se filtró con papel de filtro Whatman nº 1, y se enrasó a 25 ml con agua desionizada. En el volumen se determinaron Fe, Cu, Mn, Zn, Ca, Mg y K por absorción atómica, P por autoanalizador y B por colorimetría.

El N se determinó por mineralización Kjeldhal de las muestras secas y molidas. Se dispusieron en un matraz Kjeldahl, limpio y seco: 0,100 g de material vegetal, 0,50 g de mezcla catalizadora (100 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con 2,0 g de Se en polvo, finamente molido); añadiéndose 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. En un digestor Kjeldahl, las muestras se calentaron a 150 °C durante 30 minutos, y posteriormente a 350 °C durante dos horas. Después de dejarlo enfriar a temperatura ambiente, se enrasó a 50 ml con agua desionizada. En la disolución obtenida se determinó el contenido en N de la muestra foliar.

### **1.5.3 Determinaciones analíticas.**

#### *1.5.3.1 Determinación por absorción atómica*

Para determinar los micro y macronutrientes por absorción atómica se utilizó un aparato Perkin Elmer modelo 4000, con microprocesador incorporado dotado de lámparas de cátodo hueco y llama oxidante de aire-acetileno, así como un nebulizador de teflón con

## VI Validación agronómica de los productos

spoiler (macronutrientes) ó bola de impacto (micronutrientes). Las condiciones de medida se expresan en la tabla 29.

**Tabla 29** Condiciones de medida para la determinación de elementos minerales en el espectrofotómetro de absorción atómica.

Elemento	Lámpara	Long. onda (nm)	Apertura rendija
K*	PE.6095	769,9	0,2
Ca*	PE.6017	422,7	0,7
Mg*	PE.6042	202,6	0,7
Fe	PE.6037	248,3	0,2
Cu	PE.6024	324,8	0,7
Mn	PE.6043	279,5	0,2
Zn	PE.6081	213,9	0,7

(\*) Adición de solución eliminadora de interferencias, con 0,5 % de La como  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ , 0,02% de Cs como  $\text{CsCl}$  y  $\text{HCl}$  al 5% (v/v), en relación 1:10 (muestra:solución), diluyendo patrones de igual manera.

### *1.5.3.2. Determinación con autoanalizador colorimétrico.*

Tanto el fósforo como el nitrógeno se analizaron mediante un autoanalizador colorimétrico Technicon, con entrada continua de muestra y las siguientes condiciones de medida:

**Tabla 30** Condiciones de medida para la determinación de fósforo y nitrógeno en autoanalizador colorimétrico Technicon

Elemento	Reactivo	Longitud de onda	Referencia
P	Molibdato	660	Cadahía, 1973
N	Salicilato	660	Cadahía, 1973

### **1.5.4. Análisis de fruto**

#### *1.5.4.1. Análisis de cítricos*

##### *A) Peso y calibre de fruto*

## VI Validación agronómica de los productos

Todas las naranjas procedentes del muestreo realizado en el ensayo de Valencia fueron trasladadas al laboratorio donde se pesaron y determinaron sus calibres. Para el análisis de zumo se escogieron al azar 20 piezas por bloque y tratamiento, entre los frutos que presentaban un peso superior a 140 gramos.

### *B) Porcentaje de zumo*

Los frutos elegidos fueron de nuevo pesados y exprimidos con un exprimidor Philips de uso domestico. El volumen total de zumo se midió con una probeta, a fin de conocer la influencia de los tratamientos sobre el porcentaje de zumo. De este volumen total se seleccionaron 1000 ml, procediéndose a evaluar los parámetros de calidad que se describen a continuación.

### *C) Acidez valorable*

Se determinó mediante volumetría ácido-base. Los resultados que se obtienen corresponden a la suma de ácidos minerales y orgánicos, en términos generales, ácidos cítrico, málico, oxálico y tartárico.

Para ello se tomó una alícuota (5 ml) de muestra a la que se añadió 25 ml de agua exenta de CO<sub>2</sub>, valorándose con NaOH 0,1 M en constante agitación y utilizando fenoftaleína como indicador. La factorización del NaOH se hizo utilizando ftalato ácido potásico como patrón primario.

### *D) Determinación de sólidos solubles*

Los azúcares y ácidos orgánicos son los componentes más abundantes dentro de los sólidos solubles en zumos. La concentración de éstos se expresa en grados Brix corregidos, obtenidos a partir de la medida de los índices de refracción con un refractómetro ABBE de mesa.

Se tomaron unos mililitros de zumo que fueron filtrados a través de un algodón

## VI Validación agronómica de los productos

absorbente colocado en un embudo pequeño. Descartadas las primeras gotas, se colocaron dos sobre el prisma del refractómetro y se procedió a la lectura directa del refractómetro a 20 °C.

### *E) Determinación del ácido ascórbico*

La determinación se basa en la reducción de la sal sódica del 2,6-diclorofenol-indofenol por el ácido ascórbico (Vitamina C). Previa a la valoración de la muestra se valoró el patrón de ácido ascórbico y se realizó una prueba en blanco.

Para valorar el patrón de ascórbico se tomaron 5 ml de una disolución de ácido metafosfórico-acético (15,0 g de ácido metafosfórico puro en 40 ml de ácido acético y 200 ml de agua, enrasados a 500 ml, filtrados y conservados en nevera) y se añadieron 2,0 ml de una disolución de ácido ascórbico recientemente preparada (50 mg de ácido ascórbico en 50 ml de agua). Rápidamente se valoró con la disolución de colorante (250 mg de la sal disódica del 2,6-diclorofenol-indofenol y 210 mg de  $\text{NaHCO}_3$  enrasando a 1 litro). La valoración se consideró terminada cuando la coloración rosa se mantuvo durante 5 segundos.

La prueba en blanco se realizó sobre 5 ml de reactivo ácido metafosfórico-acético y 2 ml de agua destilada.

Por último se procedió a la determinación del ácido ascórbico en las muestras de zumo de naranja, para lo cual se mezclaron 2 ml de zumo y 5 ml de la disolución metafosfórico-acético que fueron inmediatamente valorados con la solución colorante hasta la aparición de un color rosa débil persistente. Los resultados se expresaron en mg de ácido ascórbico por 100 ml de zumo.

#### *1.5.4.2 Análisis de melocotón*

##### *A) Peso y calibre de fruto*

## VI Validación agronómica de los productos

De cada uno de los árboles muestreados se tomaron 10 melocotones al azar, pesándose y determinándose sus calibres en campo.

### *1.5.4.3 Análisis de pepino*

#### *A) Peso medio de fruto*

El peso medio del fruto ha sido calculado partiendo del número total de frutos recogidos en cada muestreo.

#### *B) Contenido en sólidos solubles*

El contenido en sólidos solubles se determinó mediante refractómetro manual, siendo cada dato la media de tres determinaciones.

#### *C) pH de la pulpa*

El pH de la pulpa se midió directamente en el fruto, utilizando un electrodo de penetración. Se efectuaron tres mediciones por dato sobre la parte central y los dos extremos del fruto, denominándose pH central a la media de estos últimos.

#### *D) Firmeza de la pulpa*

Este valor fue calculado mediante un penetrómetro con punta de 8 mm de diámetro. La medida fue tomada en los extremos peduncular y pistilar así como en la parte central del fruto. Cada dato es media de tres repeticiones.

### **1.5.5 Análisis de pigmentos**

La realización de estos análisis correspondió al personal investigador del Departamento de Biología vegetal de la Universidad de Almería, dirigidos por el Dr. Juan Luis Valenzuela y se efectuó en los experimentos sobre hortalizas. A continuación se

## VI Validación agronómica de los productos

exponen los métodos utilizados.

### *A) Clorofilas a y b*

El método seguido es el preconizado por Hiscox e Israelstam (1979). Dicho procedimiento consiste en sumergir en 10 ml de dimetil-sulfóxido taleolas de 5 mm de diámetro y un peso total de 250 mg en un baño termostatzado a una temperatura de 65°C durante 60'. Pasado dicho tiempo, se midió la intensidad del color con un espectofotómetro frente al correspondiente blanco y a las longitudes de onda indicadas por Bruinsma (1963). Los contenidos en clorofilas se expresaron en mg de clorofila por cada 100 g de peso fresco según las ecuaciones de Mckinney (1941).

### *B) Carotenos*

El procedimiento seguido fue el utilizado por Jaspar (1965) consiste en la lectura realizada en el extracto anterior a una longitud de onda de 502 nm, aplicando la fórmula propuesta por dicho autor. El resultado se expresó en mg de carotenos en 100 g de peso fresco.

### **1.6. Tratamiento estadístico de los resultados.**

Se realizó el análisis de la varianza y posterior aplicación del Test de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ) a los resultados obtenidos de los ensayos vegetales, mediante la aplicación del programa estadístico S.A.S. (S.A.S. Institute, Inc., 1985).

## **2. RESULTADOS**

Dada la extensión de los resultados estadísticos, se ha optado por la utilización de un disquete adjunto al ejemplar de esta memoria, donde se incluyen tanto el análisis de la varianza como el test de Duncan para cada uno de las experiencias vegetales realizadas. En

## VI Validación agronómica de los productos

todos los casos, se efectuó inicialmente el análisis de la varianza para la interacción tratamiento x muestreo, con el fin de valorar este efecto, pero este diseño no reflejaba la evolución del nutriente con el tiempo, por lo que se realizó un segundo estudio con independencia de los muestreos.

Las medias de cada tratamiento y muestreo, para cada uno de los parámetros evaluados, indicados en el apartado de "Materiales y métodos", se recogen en las tablas incluidas en la memoria y que serán comentadas a continuación. Además, en aquellos casos donde el análisis de la varianza denotó interacción tratamiento x muestreo significativa se incluye el valor medio de la interacción.

### **2.1. Evaluación sobre cítricos**

Los resultados correspondientes al análisis de la varianza para el ensayo de cítricos se encuentran ubicados en el directorio A:\Citrus, dentro del cual se contienen tres subdirectorios "Lanelate", "Satsuma" y "Valencia" que guardan los archivos para cada uno de estos ensayos.

#### **2.1.1. Ensayo de invernadero**

##### *2.1.1.1. Parámetros de crecimiento*

A fin de conocer el efecto del Aquamato férrico y Doliron sobre el crecimiento y desarrollo de cítricos jóvenes, se obtuvieron los valores de peso seco y fresco, de acuerdo con lo descrito en el apartado de materiales y métodos. El hecho de iniciar la experiencia con plantones permitió, además, evaluar el número de brotes y hojas nuevas en cada uno de los árboles tratados, parámetros éstos difícilmente valorables cuando se parte de árboles adultos, donde el control de hojas y brotes nuevos sería más tedioso.

Las medias de los nueve muestreos para el número de hojas y brotes se indican en la tabla 31, donde puede verse la influencia beneficiosa ejercida por el Aquamato férrico sobre el desarrollo de los brotes en las dos variedades estudiadas, especialmente en sus

## VI Validación agronómica de los productos

dosis normales. El resto de los tratamientos férricos, Fe-EDDHA y Doliron, no manifestaron esta tendencia alcanzándose valores similares o inferiores respecto el tratamiento control.

**Tabla 31** Medias de los nueve muestreos obtenidas en el número de brotes y hojas en el ensayo de invernadero. Letra diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan para un  $\alpha=0,05$ .

	Citrus v. Satsuma		Citrus v. Lane Late	
	Brotes (nº)	Hojas (nº)	Brotes (nº)	Hojas (nº)
Control	12 ab	31 a	20 ab	33 n.s.
Fe-EDDHA	9 c	23 b	16 bc	30
Aquamato	13 a	26 ab	24 a	27
2*Aquamato	12 ab	23 b	16 bc	33
Doliron	10 bc	24 b	14 c	28
2*Doliron	11 abc	30 a	18 bc	28

En cuanto al número de hojas, no se aprecian grandes oscilaciones para la variedad Lane Late, pero sí se observó un ligero incremento en las dosis dobles del Doliron en relación con el resto de los tratamientos, que no es significativo respecto el Aquamato férrico.

Con relación a los pesos secos y frescos de las hojas muestreadas para el análisis foliar, en un primer tratamiento estadístico no se evidenció interacción tratamiento x variedad, aunque si se manifestó interacción muestreo x variedad, por lo que se realizó un segundo tratamiento estadístico para cada variedad, con independencia de los muestreos. Las medias de los pesos secos y frescos obtenidas en cada uno de los muestreos se recogen en la tabla 32 y tabla 33 para la variedad Satsuma y Lane Late respectivamente.

Los resultados correspondientes a la variedad Satsuma, no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, pero conviene destacar que al final del ensayo sólo se produjo incremento neto del peso fresco en hojas procedentes de plántones que habían sido tratados con dobles dosis de Aquamato férrico. En este momento, en concreto el tercer muestreo, el mayor crecimiento del peso fresco se obtiene en el tratamiento con dosis



## VI. Validación agronómica de los productos

dobles de Doliron, niveles que no se corresponden con el peso seco de la hoja.

**Tabla 32** Resultados de peso fresco y seco en el ensayo de invernadero, para la variedad Satsuma. Letra diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan para un  $\alpha=0,05$ .

	Citrus v. Satsuma					
	Peso fresco (g·hoja <sup>-1</sup> )			Peso seco (g·hoja <sup>-1</sup> )		
	I	II	III	I	II	III
Control	0,460 n.s.	0,637 n.s.	0,522 n.s.	0,160 n.s.	0,258 n.s.	0,200 n.s.
Fe-EDDHA	0,383	0,511	0,493	0,129	0,186	0,183
Aquamato	0,468	0,674	0,467	0,167	0,279	0,172
2*Aquamato	0,415	0,424	0,575	0,148	0,194	0,180
Doliron	0,472	0,593	0,446	0,154	0,239	0,175
2*Doliron	0,457	0,582	0,582	0,149	0,235	0,179

**Tabla 33** Valores medios de peso fresco y seco en hojas de Citrus v. Lane Late cultivados en invernadero. Letra diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan para un  $\alpha=0,05$ .

	Citrus v. Lane Late					
	Peso fresco (g·hoja <sup>-1</sup> )			Peso seco (g·hoja <sup>-1</sup> )		
	I	II	III	I	II	III
Control	0,343 n.s.	0,451 n.s.	0,570 a	0,106 n.s.	0,164 n.s.	0,220 n.s.
Fe-EDDHA	0,368	0,464	0,408 b	0,180	0,163	0,165
Aquamato	0,395	0,465	0,432 ab	0,116	0,175	0,164
2*Aquamato	0,368	0,578	0,502 ab	0,109	0,201	0,188
Doliron	0,305	0,433	0,417 b	0,081	0,149	0,160
2*Doliron	0,323	0,451	0,495 ab	0,085	0,164	0,190

En la variedad Lane late, tabla 33, se observa que entre el segundo al tercer muestro no se incrementa el peso de la hoja en los plantones, en todos los tratamientos férricos a excepción del Doliron en dosis normales. Contrariamente, se manifiesta un incremento en los controles. Es en este muestreo donde, además, se refleja el efecto que ya había sido indicado en la variedad Satsuma: el peso fresco de los plantones tratados con Doliron es

## VI Validación agronómica de los productos

más elevado que el correspondiente al peso seco.

A partir de estos resultados se puede apreciar que existe un efecto positivo del Aquamato férrico, cuando este se aplica en las dosis recomendadas por el fabricante, sobre el número de brotes de los plantones de *Citrus*, tanto de la variedad Satsuma como de la Lane Late. Este efecto no es perceptible en las aplicaciones del quelato sintético.

Se observa un efecto en el crecimiento al inicio de los muestreos del Aquamato férrico, pero el descenso producido al final del ensayo hace que los valores de Doliron mejoren el resultado estadístico de las medias de los muestreos en cada tratamiento. Por otro lado, debe destacarse el efecto del Doliron en sus aplicaciones dobles, sobre el mejor desarrollo del número de hojas aunque valores, sin embargo, similares a los encontrados en el control.

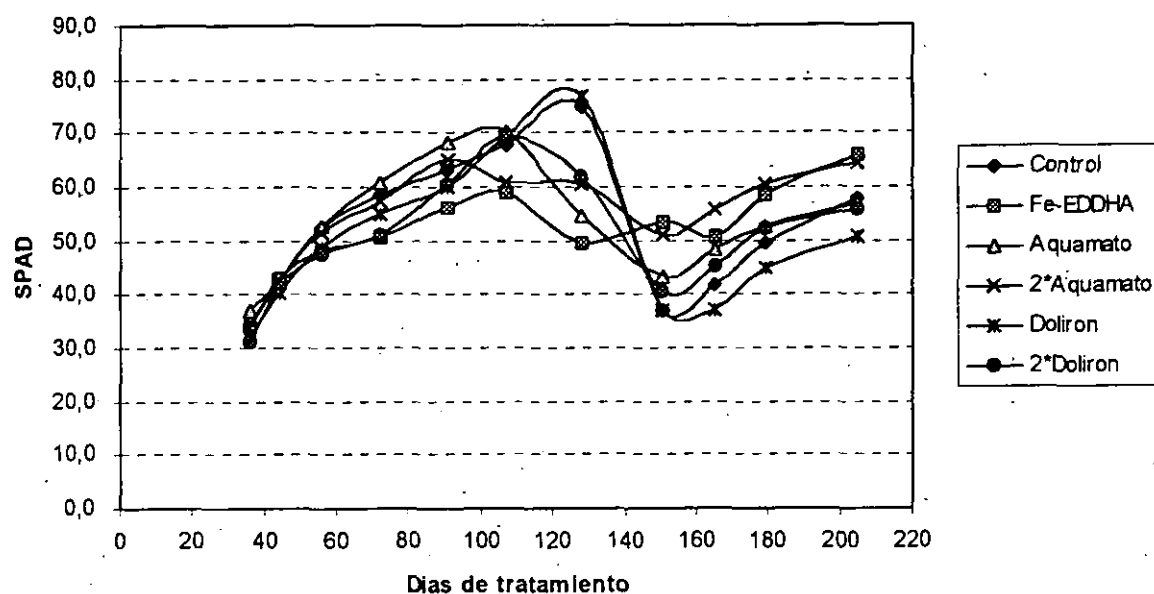
### *2.1.1.2. Índice SPAD.*

El índice SPAD se incrementó a lo largo del experimento. Desde el punto de vista estadístico no se observó ninguna diferencia entre tratamientos, aunque la tendencia en ambas variedades demostraron que este índice se incrementaba en aquellos árboles tratados con Sequestrene y dobles dosis de Aquamato férrico.

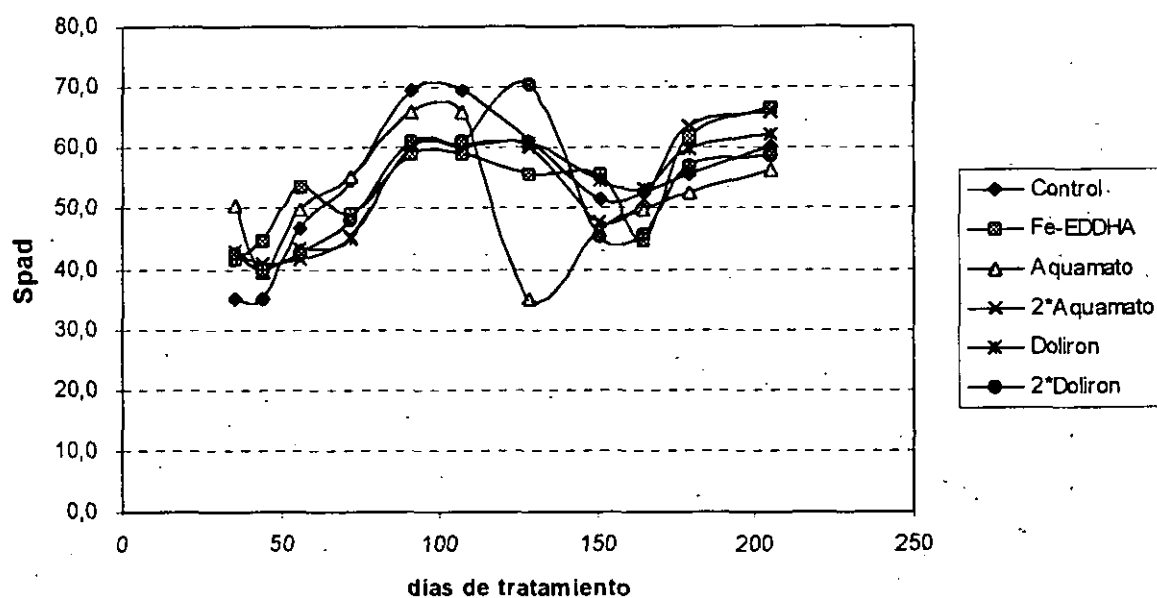
La evolución del índice SPAD a lo largo del ensayo para las variedades Satsuma y Lane late se recoge en las figuras 45 y 46. El índice se incrementa a lo largo del ensayo hasta el momento de máxima actividad fisiológica, desde donde empieza a descender. En la variedad Satsuma (figura 45) la tendencia sugerida tanto por el Fe-EDDHA, como por las dosis dobles de Aquamato férrico, es muy similar y diferente a los otros cuatro tratamientos. En estos últimos se aprecia un pico y un valle muy pronunciado, especialmente en el control y en el Doliron.

## VI Validación agronómica de los productos

**Figura 45** Evolución del índice SPAD en hojas de *Citrus* variedad Satsuma en el ensayo de invernadero.



**Figura 46** Evolución del índice SPAD en hojas de *Citrus* variedad Lane late en el ensayo de invernadero.



En la variedad Lane Late, también se confirma la tendencia de las dosis dobles del Aquamato férrico similar a la del Fe-EDDHA, y se manifiesta la mejora sobre las dosis dobles del Doliron.

## VI Validación agronómica de los productos

De los datos del índice SPAD podemos concluir que tanto el Aquamato férrico en dosis dobles como el Sequestrene presentan un comportamiento similar. Es una tendencia más estable que la mostrada por el resto de los tratamientos. De otro lado, no se alcanzan los mayores valores del índice SPAD para el Aquamato férrico y el Fe-EDDHA hasta 140 días del inicio de los tratamientos para la variedad Satsuma y hasta 170 días para la variedad Lane late.

### 2.1.1.3. Análisis mineral.

#### A) Macronutrientes

A continuación se describirá el efecto de los tratamientos sobre los macronutrientes en el ensayo de invernadero, incidiendo en su acción sobre los muestreos, incluso en aquellos casos donde no se reflejó interacción tratamiento x muestreo.

**Tabla 34** Concentración de N ( $\text{g } 100\text{g}^{-1} \text{ m.s}$ ) en hojas de *Citrus* cultivados en invernadero para cada uno de los tratamientos y muestreos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativa según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

	II	III	<M>
Citrus v. Satsuma			
Control	1,69 ab	2,74 ab	
Fe-EDDHA	1,89 a	2,02 c	
Aquamato	1,69 ab	2,36 a	
2*Aquamato	2,02 a	2,26 ab	
Doliron	1,34 b	2,11 bc	
2*Doliron	1,67 ab	2,39 a	
Citrus v. Lane Late			
Control	1,57 b	2,38 n.s	1,97 b
Fe-EDDHA	1,89 ab	2,33	2,11 ab
Aquamato	1,55 b	2,47	2,01 ab
2*Aquamato	1,75 ab	2,73	2,06 ab
Doliron	1,94 a	2,57	2,25 a
2*Doliron	1,65 ab	2,40	2,03 ab

<M> Representa las medias entre muestreo

## VI Validación agronómica de los productos

Con relación a la concentración de N, en la tabla 34 sólo se muestran los resultados obtenidos para la concentración foliar de este macronutriente en los dos últimos muestreos, ya que a causa de la escasez del material vegetal al inicio del ensayo no se pudo proceder a la mineralización Kjeldahl. No se observa un efecto claro de los tratamientos sobre los niveles de N en la variedad Satsuma, a excepción del Doliron, que incidió efectivamente al inicio del ensayo, pero la asimilación de este macronutriente disminuyó, alcanzándose niveles inferiores a los considerados bajos por Jones y col. (1991) (2,20-2,39%). En ningún momento se apreciaron diferencias significativas respecto al control.

**Tabla 35** Concentración de P ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  m.s.) en hojas de *Citrus* cultivados en invernadero. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

Citrus v. Satsuma				
	I	II	III	<M>
Control	0,157 ab	0,124 n.s.	0,118 b	0,133 b
Fe-EDDHA	0,105 b	0,142	0,136 ab	0,143 ab
Aquamato	0,158 ab	0,128	0,125 ab	0,137 ab
2*Aquamato	0,154 ab	0,135	0,146 a	0,145 ab
Doliron	0,157 ab	0,130	0,119 ab	0,136 ab
2*Doliron	0,178 a	0,125	0,140 ab	0,148 a
Citrus v. Lane late				
	I	II	III	<M>
Control	0,151 n.s.	0,150 n.s.	0,142 n.s.	0,148 ab
Fe-EDDHA	0,181	0,164	0,141	0,162 ab
Aquamato	0,190	0,140	0,135	0,155 ab
2*Aquamato	0,219	0,136	0,138	0,164 ab
Doliron	0,208	0,185	0,150	0,181 a
2*Doliron	0,149	0,149	0,137	0,145 b

<M> Media entre los muestreos

La aplicación de los tratamientos afectó a los niveles foliares de P en las dos variedades de cítricos ensayadas, siendo el tratamiento con Doliron el más efectivo aunque la tendencia con la dosis no fue la misma. Como puede verse en la tabla 35, los niveles de este elemento decrecen a lo largo del ensayo en todos los tratamientos. El fósforo es un elemento de los denominados estructurales, que incide con gran intensidad en el desarrollo

## VI Validación agronómica de los productos

radicular, y especialmente activo en los procesos de floración y cuaje de fruto. La ausencia de floración provocada y una situación nutricional suficiente deberían presentar unos valores constantes. Se aprecian diferencias significativas entre tratamientos en el primer y en el tercer muestreo en la variedad Satsuma, pero no ocurre lo mismo en la variedad Lane late.

**Tabla 36** Concentración de K ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  m.s) en hojas de *Citrus* cultivados en invernadero para cada uno de los tratamientos y muestreos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

Citrus v. Satsuma				
	I	II	III	
Control	1,00b	0,94n.s	1,29c	
Fe-EDDHA	1,18ab	1,22	1,30c	
Aquamato	1,08ab	1,01	1,86a	
2*Aquamato	1,07ab	0,96	1,66ab	
Doliron	1,02b	0,98	1,52bc	
2*Doliron	1,26a	0,99	1,29c	
Citrus v. Lane late				
	I	II	III	<M>
Control	1,31 n.s.	1,37 n.s.	1,59 n.s	1,43 n.s.
Fe-EDDHA	1,49	1,71	1,42	1,54
Aquamato	1,42	1,43	1,34	1,40
2*Aquamato	1,38	1,41	1,46	1,42
Doliron	1,53	1,68	1,37	1,53
2*Doliron	1,60	1,27	1,56	1,48

<M> Representa las medias entre muestreos.

En la variedad Satsuma se reflejan diferencias significativas de este macronutriente al inicio y término del ensayo, sin ser apreciables en el muestreo intermedio. Inicialmente, son las dosis dobles de Doliron las que más parecen beneficiar a la concentración de fósforo, observándose al final del ensayo una incidencia mayor de las dosis dobles del Aquamato férreo.

En la tabla 36 se presentan los contenidos foliares de K, para cada tratamiento,

## VI Validación agronómica de los productos

muestreo y variedad estudiada, donde existe una interacción tratamiento x muestreo significativa en la variedad Satsuma. Siendo en esta variedad en la que la aplicación de los tratamientos parece afectar en mayor medida al contenido total de potasio, mientras que no se manifiestan diferencias significativas entre tratamientos en la variedad Lane Late. En la variedad Satsuma, originariamente, fueron las aplicaciones dobles de Doliron las que produjeron un efecto más favorable, que se mantuvo, sin embargo, por debajo de los valores encontrados para el resto de los tratamientos al final del ensayo. Momento éste en el que los niveles de K mejoraron en los tratamientos con Aquamato férrico, principalmente a las dosis normales. En esta ocasión la concentración de K es elevada, pero no supera los límites superiores (1,10-2,3 %).

**Tabla 37** Concentración de Ca ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  m.s) en hojas de *Citrus* cultivados en invernadero para cada uno de los tratamientos y muestreos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el Test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

	I	II	III
Citrus v. Satsuma			
Control	1,32 bc	1,99 c	2,19 ab
Fe-EDDHA	1,20 c	2,15 bc	2,45 a
Aquamato	1,63 ab	2,63 ab	2,19 ab
2*Aquamato	1,92 a	2,77 ac	2,28 ab
Doliron	1,43 bc	2,03 cb	1,79 b
2*Doliron	1,25 bc	2,18 bc	2,03 ab
Citrus v. Lane Late			
Control	1,82 a	2,41 a	2,76 a
Fe-EDDHA	0,85 c	1,81 b	2,77 a
Aquamato	1,77 a	2,57 a	2,40 b
2*Aquamato	1,10 bc	2,46 ab	2,90 a
Doliron	1,61 ab	2,29 ab	2,74 a
2*Doliron	1,47 ab	2,20 ab	2,39 b

La concentración del Ca, expuesta en la tabla 37, evolucionó positivamente a lo largo de la experiencia en todos los tratamientos, excepto en los plántones tratados con dosis normales de Aquamato férrico. Este tratamiento fue el único que mantuvo la

## VI Validación agronómica de los productos

concentración de Ca dentro de los límites suficientes a lo largo del ensayo (1,50-2,59 %), si bien disminuye en el último muestreo donde este efecto es significativo. Aunque se presenta en las dos variedades es especialmente notorio en la variedad Lane Late.

De nuevo se observa el efecto sobre el Magnesio, que era esperado por la modificación con dolomita del Doliron. En la tabla 38 se muestran los resultados de concentración de Mg obtenidos del análisis de la varianza y el Test de Duncan. La tendencia describe al Doliron como el producto capaz de incrementar en mayor medida los niveles de este elemento en hoja. Como ya se indicó en la variedad Lane Late, la incidencia es proporcional a las dosis aplicadas. Sin embargo, en la variedad Satsuma, la concentración

**Tabla 38** Concentración de Mg ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  m.s) en hojas de *Citrus* cultivados en invernadero para cada uno de los tratamientos y muestreos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el Test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

	Citrus v. Satsuma			
	I	II	III	<M>
Control	0,192 c	0,301 c	0,301 c	
Fe-EDDHA	0,236 bc	0,290 c	0,290 c	
Aquamato	0,237 bc	0,307 c	0,307 c	
2*Aquamato	0,227 bc	0,326 c	0,326 c	
Doliron	0,283 b	0,447 b	0,447 b	
2*Doliron	0,393 a	0,612 a	0,612 a	

	Citrus v. Lane late			
	I	II	III	<M>
Control	0,254 b	0,304 b	0,279 c	0,279 c
Fe-EDDHA	0,272 b	0,316 b	0,284 cd	0,291 c
Aquamato	0,302 b	0,319 b	0,256 d	0,292 c
2*Aquamato	0,294 b	0,314 b	0,310 c	0,306 c
Doliron	0,352 b	0,521 a	0,394 b	0,422 b
2*Doliron	0,435 a	0,615 a	0,495 a	0,515 a

<M> Media entre los muestreos

de Mg se incrementó hasta el segundo muestreo para retomar valores próximos a los iniciales al final del ensayo.



## VI Validación agronómica de los productos

Resumiendo estos resultados, se puede indicar que independientemente de la variedad se observa una influencia en el Mg y el Ca. En el Ca el Aquamato férrico incrementa los niveles desde el inicio del ensayo, mostrándose su efecto inicial con las dosis normales y a continuación con las dobles. El efecto del magnesio no es exclusivo del Doliron, que como se ha indicado a lo largo de la memoria sería consecuencia de la modificación con Dolomita. También el Aquamato férrico muestra este efecto, mejorándose los niveles de Mg con el tiempo. Las dosis normales favorecen la adquisición del elemento por la planta, hasta el tercer muestreo en el que la dosis dobles lo favorecen en mayor medida.

No se observa influencia del P en la variedad Lane Late, ni tampoco del K en la misma variedad. Sin embargo, en la variedad Satsuma se aprecia influencia de los tratamientos sobre el P, dado que las dosis dobles de los fulvatos incrementaron los niveles de este macronutriente al final del ensayo, cuando todos disminuían. Además se observa un efecto sobre el N del Aquamato férrico, inicialmente en las dosis normales y con posterioridad en las dobles. Por último, recalcar el efecto del K, incrementado en el primer muestreo por el tratamiento con Doliron, y en el tercer muestreo por el Aquamato férrico en ambas dosis.

### *B) Micronutrientes*

Desde el punto de vista estadístico, en un primer estudio se comprobó la existencia de una interacción significativa entre tratamientos x variedades para los contenidos totales de Cu y Zn, lo que implica que estos dos elementos no presentaron la misma evolución para ambas variedades al aplicarse los tratamientos. Por el contrario, tanto las concentraciones de Fe como de Mn presentaron esta interacción de forma altamente significativa en las dos variedades.

Dadas las características del Aquamato férrico, especialmente su elevado contenido en Fe total y materia orgánica, se esperaría que este producto tuviera una marcada incidencia sobre la concentración foliar de este elemento. No obstante, los resultados no lo

## VI Validación agronómica de los productos

demuestran. La tabla 39 refleja la concentración de Fe para cada uno de los tratamientos

**Tabla 39** Concentración de Fe (mg·Kg<sup>-1</sup> m.s) en hojas de *Citrus* cultivados en invernadero para cada uno de los tratamientos y muestreos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

	I	II	III
<b>Citrus v. Satsuma</b>			
Control	18,1 c	41,3 b	29,9 d
Fe-EDDHA	125 a	153 a	86,1 a
Aquamato	41,5 b	42,8 b	36,4 c
2*Aquamato	31,1 bc	42,6 b	42,2 b
Doliron	28,8 bc	40,7 b	26,2 d
2*Doliron	39,4 bc	41,4 b	29,9 d
<b>Citrus v. Lane Late</b>			
Control	29,4 bc	46,7 b	43,6 b
Fe-EDDHA	50,4 ab	188 a	133 a
Aquamato	25,8 c	50,7 b	40,7 b
2*Aquamato	38,6 abc	45,8 b	42,6 b
Doliron	50,8 ab	45,2 b	39,3 b
2*Doliron	54,0 a	40,4 b	44,4 b

independientemente de cada variedad y muestreo.

En principio y en todos los casos se manifiesta la ventaja de los quelatos sintéticos como correctores de la clorosis férrica, dados los excelentes resultados del Fe-EDDHA frente al resto de los tratamientos. No se reveló incidencia ni positiva ni negativa, sobre la concentración de este micronutriente en la variedad Lane Late cuando se aplicaron los tratamientos de Aquamato férrico y Doliron, salvo en el primer muestreo para este último. De forma contraria, se observaron ligeros efectos congruentes con las características de Aquamato férrico en la variedad Satsuma. Al final del ensayo este producto fue capaz de incrementar significativamente respecto del control los niveles de Fe en hoja, de acuerdo con las dosis aplicadas. El tratamiento con Doliron no mostró ninguna diferencia con respecto al control.

## VI Validación agronómica de los productos

Los plantones mostraron concentraciones totales de Fe foliar bajas, a excepción de aquellos que fueron tratados con Fe-EDDHA que presentaron niveles suficientes. Los controles y los tratamientos con Doliron, especialmente las dosis normales en la variedad Satsuma, rozaron la deficiencia al inicio y al final del ensayo.

Dados los bajos niveles de Fe presentados en algunos tratamientos, como los controles y el Doliron, se esperaba que los niveles de Mn se incrementaran en estos casos. Antes al contrario, no se manifestó un efecto claro sobre los niveles de foliares de Mn, como puede apreciarse en la tabla 40, a excepción de un significativo incremento inicial de la doble dosis de Aquamato férrico que no perdura a lo largo del ensayo.

**Tabla 40** Concentración de Mn ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  m.s) en hojas de *Citrus* cultivados en invernadero para cada uno de los tratamientos y muestreos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

	I	II	III
<b>Citrus v. Satsuma</b>			
Control	17,6 b	12,5 n.s.	10,7 n.s.
Fe-EDDHA	16,2 b	13,5	12,3
Aquamato	16,0 b	15,5	9,50.
2*Aquamato	18,7 ab	13,7	9,87
Doliron	15,8 b	13,5	8,97
2*Doliron	23,2 a	13,7	11,1
<b>Citrus v. Lane Late</b>			
Control	14,7 b	11,7 n.s.	10,1 n.s.
Fe-EDDHA	23,4 b	14,3	13,7
Aquamato	22,6 b	13,7	9,80
2*Aquamato	42,2 a	12,9	10,3
Doliron	21,2 b	11,6	13,1
2*Doliron	21,9 b	13,9	10,4

La habilidad para transportar Cu por el quelato EDDHA se pone de manifiesto en los niveles alcanzados por este elemento en los tratamientos con Fe-EDDHA, tanto en la variedad Satsuma como en la variedad Lane Late, recogidos en la tabla 41. La incidencia

## VI Validación agronómica de los productos

del resto de los tratamientos sobre la movilización de Cu presenta diferentes tendencias según se trate de la variedad Satsuma o Lane Late. En la primera, tanto el Aquamato férrico como el Doliron parecen retener el elemento, ya que se alcanzan niveles inferiores a los del control. Mientras que en la variedad Lane Late el Aquamato férrico incrementa el Cu foliar a concentraciones similares al Fe-EDDHA y no se muestran diferencias significativas respecto el resto de los tratamientos.

**Tabla 41** Concentración de Cu (mg·Kg<sup>-1</sup> m.s) en hojas de *Citrus* cultivados en invernadero para cada uno de los tratamientos y muestreos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

	I	II	III	<M>
<b>Citrus v. Satsuma</b>				
Control	7,89 ab	7,55 ab	3,12 b	6,19 b
Fe-EDDHA	9,90 a	7,95 a	4,20 a	7,35 a
Aquamato	7,37 ab	6,15 c	3,92 ab	5,82 bc
2*Aquamato	8,65 ab	5,80 c	3,10 b	5,85 bc
Doliron	6,82 b	5,37 c	2,87 b	5,02 c
2*Doliron	8,24 ab	6,50 bc	3,37 b	5,97 bc
<b>Citrus v. Lane Late</b>				
Control	5,30 b	5,95 n.s.	2,22 c	4,49 b
Fe-EDDHA	9,25 ab	7,82	5,52 a	7,62 a
Aquamato	10,60 a	7,85	2,40 c	6,95 a
2*Aquamato	8,07 ab	6,00	3,57 b	5,88 ab
Doliron	7,93 ab	6,97	3,77 b	6,23 ab
2*Doliron	8,22 ab	6,47	3,82 b	6,18 ab

<M> Representa las medias entre muestreo.

Los resultados correspondientes a la concentración foliar de Zn se indican en la tabla 42. Parece existir un efecto del Aquamato férrico sobre este micronutriente, independientemente de la variedad. En los dos casos se mostró incremento de este elemento, aunque en la variedad Lane Late las diferencias entre tratamientos no eran significativas. Es importante destacar que en esta variedad la concentración de este elemento se presenta a nivel de deficiencia. Además, las dosis dobles de los humatos aminoran la absorción de Zn.

## VI Validación agronómica de los productos

**Tabla 42** Concentración de Zn ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}\text{ m.s}$ ) en hojas de *Citrus* cultivados en invernadero para cada uno de los tratamientos y muestreos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan. ( $\alpha=0,05$ )

	I	II	III	<M>
<i>Citrus v. Satsuma</i>				
Control	11,3 ab	11,4 ab	5,85 n.s.	9,51 ab
Fe-EDDHA	10,3 ab	10,1 b	5,62	8,69 b
Aquamato	12,3 a	13,1 a	5,72	10,4 a
2*Aquamato	9,86 ab	9,50 b	5,72	8,30 b
Doliron	9,93 ab	10,8 ab	4,12	8,29 b
2*Doliron	9,33 b	10,5 b	4,52	8,12 b
<i>Citrus v. Lane Late</i>				
Control	10,4 ab	11,6 n.s.	7,27 n.s.	9,77 n.s.
Fe-EDDHA	10,4 ab	11,5	6,52	9,48
Aquamato	12,9 a	11,5	5,87	10,0
2*Aquamato	8,89 b	10,3	7,60	8,95
Doliron	11,6 ab	11,7	5,92	9,75
2*Doliron	10,2 ab	10,3	6,12	8,87

<M> Representa las medias entre muestreo.

### *2.1.1.4 Efecto sobre la nutrición férrica.*

Como ya se ha indicado en el apartado de la introducción la concentración de Fe foliar no es generalmente indicativa del estado férrico de la planta, que sí puede ser descrito por las relaciones entre diferentes elementos. De las muchas descritas en la bibliografía se han escogido tres; Fe/Mn, N/Ca y  $50(10P+K)/\text{Fe}$ . Un incremento en la relación Fe/Mn, indica mejora en el estado férrico de la planta, mientras que las otras dos muestran la tendencia contraria. Las figuras 47 a la 52 recogen las relaciones Fe/Mn, N/Ca y  $50(10P+K)/\text{Fe}$  obtenidas para cada uno de los tratamientos. Según estos parámetros se puede indicar, que tanto en la variedad Satsuma como el variedad Lane Late, se manifiesta el tratamiento de Sequestrene como el más eficaz para mejorar la nutrición férrica de estos cultivos en las condiciones estudiadas. El resto de los tratamientos no presenta una tendencia tan clara y definida como el tratamiento indicado.

## VI Validación agronómica de los productos

La interpretación detallada de los resultados de las dosis dobles de los humatos respecto al tratamiento control refleja mejora de la relación Fe/Mn para los plantones de la variedad Satsuma (figura 47) fundamentalmente al final del ensayo. Demostrándose una vez más la efectividad de los compuestos tipo fulvato en aplicaciones a largo plazo. Las otras dos relaciones, N/Ca y  $50(10P+K)/Fe$ , recogidas en las figuras 49 y 51, también denotan la mejora del tratamiento donde fue utilizado el quelato sintético. En concreto, la relación N/Ca (figura 49) obtenida para el Sequestrene muestra una tendencia muy favorable al inicio del ensayo, manteniéndose en los dos últimos muestreos. Los elevados valores resultantes de las aplicaciones con el Aquamato férrico denotan la baja eficacia de este producto para paliar la clorosis férrica. Sin embargo, como ya ha sido indicado en el caso de la relación Fe/Mn, la relación N/Ca en hojas de *Citrus* v. Satsuma mejoró en el segundo y tercer muestreo en todos los tratamientos, tal y como demuestran los menores valores obtenidos. Un comportamiento similar se manifiesta en la relación  $50(10P+K)/Fe$  (figura 51) donde el tratamiento con Sequestrene se mantiene como el de mayor efectividad. Bien es cierto que esta relación indica que la nutrición férrica no mejoró a lo largo del ensayo, dado que los valores mostrados en ese momento fueron los mayores. Además del Sequestrene, todos los tratamientos incrementan ligeramente los valores para la relación  $50(10P+K)/Fe$ . Un efecto que se ha comentado en la absorción de los nutrientes y que ahora se manifiesta de nuevo, es la mejora que suponen las dosis sencillas al principio de los tratamientos, mientras que al final de éstos son las dosis dobles las que parecen ser más eficaces.

Los valores para las relaciones de elementos vinculados a la nutrición férrica, presentaron algunas diferencias en la variedad Lane Late. Si bien la relación Fe/Mn (figura 48) pone de manifiesto, de nuevo, que el tratamiento Fe-EDDHA es el más beneficioso, no aparecen muchas diferencias entre los demás tratamientos y el control. De otro lado, parece que las dosis normales del Aquamato férrico inciden positivamente sobre la nutrición férrica, mientras que las dosis elevadas aminoran este efecto. La relación  $50(10P+K)/Fe$  refleja la misma tendencia, y por otra parte no parecen modificarse especialmente a lo largo del ensayo. Por el contrario esto no ocurre con la relación N/Ca, (figura 50) donde el tratamiento Fe-EDDHA presenta los valores más elevados que se mantienen en el muestreo posterior.

Figura 47 Relación Fe/Mn en *Citrus* vr. Satsuma cultivados en invernadero de investigación

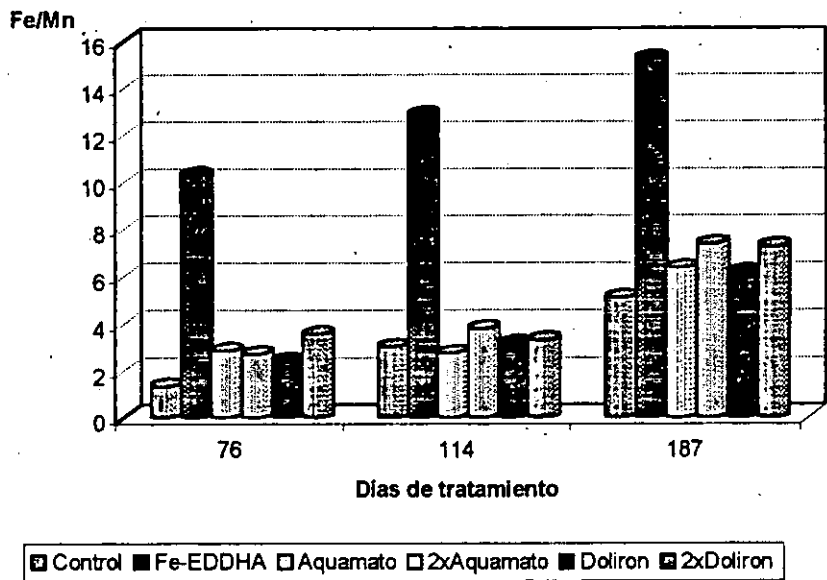


Figura 48 Relación Fe/Mn en *Citrus* vr. Lane Late cultivados en invernadero de investigación

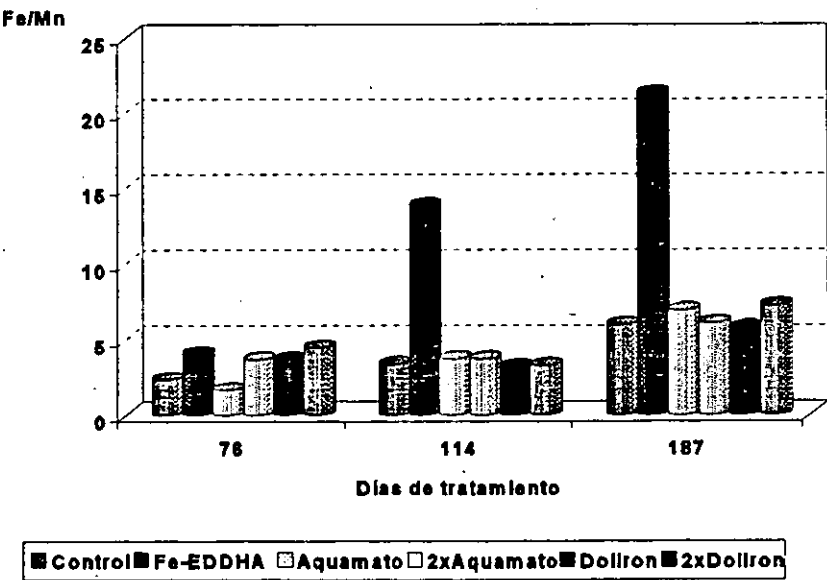


Figura 49 Relación N/Ca en *Citrus* vr. Satsuma cultivados en invernadero de investigación

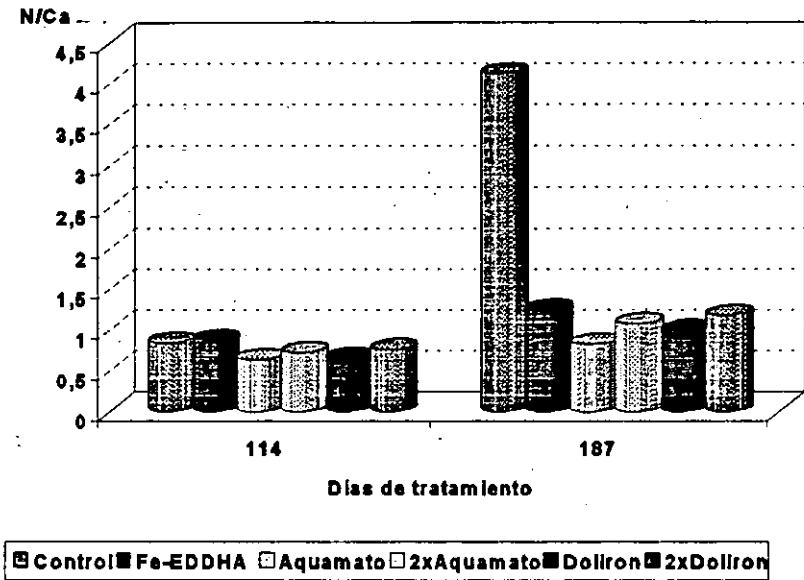
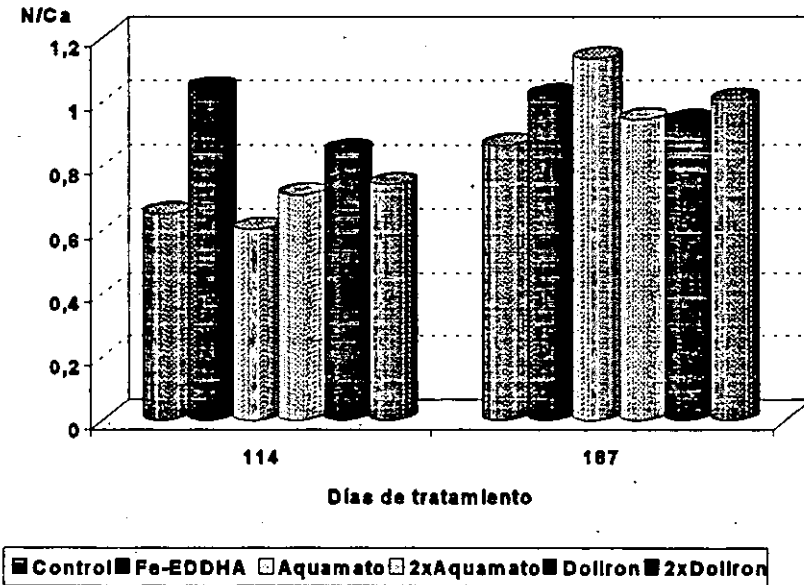
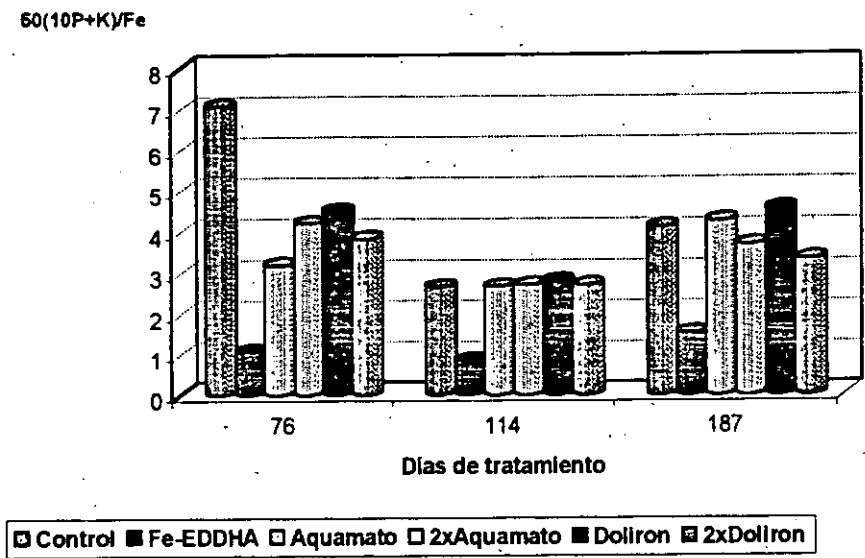


Figura 50 Relación N/Ca para Citrus vr Lane Late cultivados en invernadero de investigación

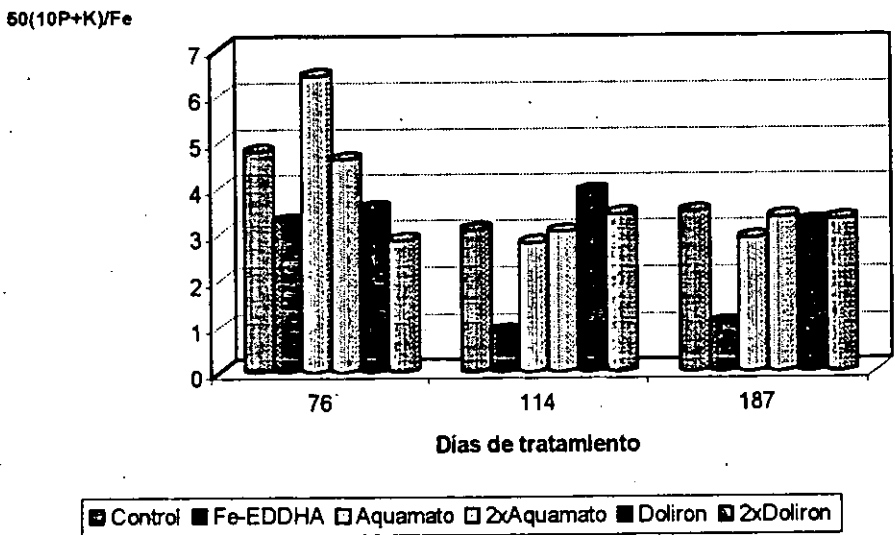




**Figura 51** Relación 50(10P+K)/Fe en *Citrus* vr. Satsuma cultivados en invernadero de investigación



**Figura 52** Relación 50(10P+K)/Fe en *Citrus* vr. Lane Late cultivados en invernadero de investigación



## VI Validación agronómica de los productos

### 2.1.1.5. Resumen de resultados

Como resumen de los resultados expuestos acerca del efecto de los tratamientos férricos se puede afirmar que:

- el crecimiento de brotes y hojas en cítricos cultivados en las condiciones descritas en invernadero de investigación, han demostrado la eficacia de estos productos, especialmente el Aquamato férrico, y en menor medida el Doliron. Es discutible que este efecto sea debido exclusivamente a la mejora a la absorción de nutrientes beneficiada en parte por el elevado porcentaje de materia orgánica y principalmente como ácido fúlvico que forma parte de la composición del Aquamato férrico. Tampoco es atribuible exclusivamente a una mejora en la nutrición férrica, ya que a esto contribuye mayoritariamente el Fe-EDDHA que por otra parte no incide sobre el crecimiento del número de brotes, como los tratamientos ya descritos.

- La dosis de aplicación es determinante a la hora de evaluar la eficacia de estos productos, ya que si bien las dosis recomendadas por los fabricantes favorecieron el crecimiento de los brotes, las dosis elevadas amortiguaron estos efectos.

- La aplicación del Aquamato férrico y del Doliron parece favorecer la asimilación de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  incluso en presencia de concentraciones foliares elevadas de  $\text{K}^+$ . También incrementa los contenidos foliares de  $\text{Zn}^{2+}$  y a largo plazo de  $\text{Fe}^{3+}$ . Por el contrario, no parece tener influencia sobre los niveles foliares de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . La incidencia sobre los elementos estructurales, P y N depende de la variedad, ya que si bien en algún momento del ensayo se vió afectada la concentración de P en la variedad Satsuma, no se manifestó en la variedad Lane Late.

## VI Validación agronómica de los productos

### 2.1.2. Ensayo de campo

#### 2.1.2.1. Parámetros de crecimiento

Siguiendo el mismo criterio que en el ensayo de invernadero, como parámetros de crecimiento se atendió al peso fresco y seco por hoja durante las dos temporadas en las que tuvo lugar el ensayo de campo.

**Tabla 43** Peso fresco (g·hoja<sup>-1</sup>) en hojas de *Citrus* vr. Navelina en el ensayo de Bétera. Temporada 94/95 y 95/96. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0.05$ ).

	94/95					95/96		
	I	II	III	IV	<M>	I	II	<M>
Control	0,521ns	0,853ns	0,898ab	0,798ns	0,767ns	0,823ns	0,649ab	0,746ab
Fe-EDDHA	0,543	0,835	0,845ab	0,949	0,793	0,851	0,656ab	0,753ab
Aquamato	0,482	0,828	0,824b	0,924	0,773	0,767	0,573b	0,670c
2*Aquamato	0,518	0,823	0,850ab	0,949	0,785	0,780	0,693a	0,737ab
Doliron	0,669	0,860	0,941ab	0,820	0,814	0,761	0,648ab	0,705bc
2*Doliron	0,645	0,887	0,961a	0,810	0,826	0,856	0,706a	0,781a

<M>\* Representa medias entre muestreos

**Tabla 44** Peso seco (g·hoja<sup>-1</sup>) en hojas de *Citrus* vr. Navelina en el ensayo de Bétera. Temporadas 94/95 y 95/96. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0.05$ ).

	94/95					95/96		
	I	II	III	IV	<M>	I	II	<M>
Control	0,117a	0,248ns	0,338ab	0,326ns	0,257ns	0,233ns	0,292ns	0,263ab
Fe-EDDHA	0,119ab	0,257	0,316b	0,327	0,255	0,236	0,290	0,263ab
Aquamato	0,105b	0,240	0,311b	0,332	0,250	0,212	0,267	0,240b
2*Aquamato	0,110b	0,256	0,323ab	0,321	0,252	0,219	0,307	0,263ab
Doliron	0,117ab	0,244	0,362ab	0,361	0,278	0,212	0,285	0,249ab
2*Doliron	0,142a	0,260	0,370a	0,348	0,281	0,234	0,306	0,270a

<M>\* Representa medias entre muestreos

Se encontraron resultados similares en las dos temporadas, recogidos en las tablas

## VI Validación agronómica de los productos

43 y 44. Tanto el peso fresco como el peso seco en hoja se vieron mejorados en aquellos árboles tratados con doubles dosis de Doliron, y aunque este efecto no sea significativo en todos los casos la tendencia está bastante definida. En el transcurso de la temporada 94/95 el Aquamato férrico incidió positivamente sobre el peso seco, pero no manifestó un efecto análogo sobre el peso fresco hasta el final del ensayo. Momento en el cual las hojas procedentes de cítricos tratados con las dosis doubles de este producto presentaron los mejores rendimientos, tanto en la temporada 94/95 como en la siguiente. El estudio comparativo con el quelato sintético indica que este tratamiento produjo resultados cuantitativamente similares al tratamiento con Doliron al inicio del ensayo, incidiendo particularmente sobre el peso seco de hoja mientras que con el transcurso de la experiencia su efecto se concentra sobre el peso fresco de la hoja.

**Tabla 45** Índice de área foliar ( $\text{g PF} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) en la temporada 95/96 Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas.

	I	II	T*M
Control	0,318ns	0,319ns	0,319ns
Fe-EDDHA	0,302	0,312	0,308
Aquamato	0,311	0,317	0,314
2*Aquamato	0,342	0,303	0,323
Doliron	0,300	0,330	0,315
2*Doliron	0,320	0,345	0,332

<M> Representa las medias entre muestreo.

Durante la temporada 94/95 se encontraron diferencias en el tamaño de hoja, por lo que se consideró la posibilidad de evaluar el índice de área foliar (LAI), recogida en la tabla 45. Este parámetro es una medida indicativa del grosor de la hoja que se expresa como gramos de peso fresco  $\text{cm}^{-2}$ . Las dosis doubles de Doliron presentaron el mayor índice de área foliar, de modo que el mayor peso seco que presenta es debido

fundamentalmente, a un mayor espesor de hoja y no a un mayor área, aunque las diferencias de tamaño indicadas no son significativas.

### *2.1.2.2. Índice SPAD.*

Con relación al índice SPAD, mostrado en la tabla 46, sólo se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos Fe-EDDHA y las dosis normales del Doliron durante el tercer muestreo de la temporada 94/95, que corresponde al momento de engorde,

## VI Validación agronómica de los productos

del fruto. En la temporada siguiente, no se realizó toma de muestra en ese momento por lo que puede no confirmarse esta tendencia, pero en la primera toma de muestra se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. En esa ocasión existían diferencias significativas del Aquamato férrico con el Doliron en dobles dosis, pero no con el resto de los tratamientos.

**Tabla 46** Índice SPAD en hojas de Citrus v. Navelina en el ensayo de Bétera. Temporadas 94/95 y 95/96 Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

	94/95					95/96		
	I	II	III	IV	<M>	I	II	<M>
Control	33,4ns	50,9ns	66,9ab	70,3ns	55,4ab	47,6a	80,3ns	64,0ns
Fe-EDDHA	33,0	53,3	71,1a	70,3	56,94a	46,4ab	79,9	63,2
Aquamato	32,3	49,7	64,2b	70,0	54,1b	48,2a	80,5	64,4
2*Aquamato	31,9	51,8	66,3ab	69,6	54,9ab	47,6a	81,0	64,3
Doliron	31,6	50,1	68,9a	71,7	55,6ab	46,5ab	79,8	63,2
2*Doliron	32,7	49,5	69,3a	62,3	54,9ab	44,0b	80,2	62,1

<M> Representa las medias entre muestreos.

### 2.1.2.3. Análisis mineral

#### A) Macromutrientes

La aplicación del tratamiento estadístico a los resultados de campo indicó que no existía interacción tratamiento x muestreo durante el periodo de tiempo que duró el ensayo para ninguno de los macronutrientes, excepto en los valores de Mg y K en la temporada 95/96. En la tablas 47 y 48 se presentan los resultados correspondientes a la concentración de macronutrientes en cada uno de los muestreos realizados y durante los dos años en que se desarrolló la experiencia.

Con relación a la concentración foliar de N, recogida en la tabla 47, ésta se vio incrementada al inicio de los tratamientos en los árboles tratados con dobles dosis de Aquamato férrico y en los dos años consecutivos. El efecto contrario se produjo en las aplicaciones dobles de Doliron, caracterizadas por un significativo descenso en los niveles

## VI Validación agronómica de los productos

de este elemento.

**Tabla 47** Concentración foliar de N, P, y K (g·100 g<sup>-1</sup> m.s.) en el ensayo de campo, Bétera. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan para ( $\alpha=0,05$ )

<u>Citrus v. Navelina</u>								
94/95					95/96			
N	I	II	III	IV	<M>*	I	II	<M>*
Control	2,50ab	1,93ns	2,00abc	2,14a	2,14a	1,93ab	2,10ns	2,01ns
Fe-EDDHA	2,46ab	1,87	2,05a	2,07ab	2,11ab	1,89ab	2,07	2,02
Aquamato	2,48ab	1,94	1,90bcd	1,93b	2,07ab	2,01a	2,04	2,03
2*Aquamato	2,61a	1,87	1,86d	2,02ab	2,09ab	2,00a	2,19	2,10
Doliron	2,46ab	1,95	2,02ab	2,04ab	2,04b	1,94ab	2,11	2,03
2*Doliron	2,37b	1,90	1,91cd	1,95b	2,12ab	1,86b	2,09	1,98
P								
Control	0,362ab	0,137ns	0,103ns	0,105ab	0,177ns	0,121ns	0,100ns	0,115b
Fe-EDDHA	0,381ab	0,140	0,106	0,114a	0,182	0,134	0,108	0,121a
Aquamato	0,374ab	0,153	0,095	0,107ab	0,185	0,133	0,105	0,119a
2*Aquamato	0,397a	0,137	0,097	0,110a	0,185	0,133	0,107	0,120a
Doliron	0,355ab	0,147	0,095	0,090b	0,173	0,132	0,107	0,120a
2*Doliron	0,380ab	0,142	0,091	0,105ab	0,179	0,126	0,114	0,120a
K								
Control	1,28a	1,29ns	1,29ns	0,752c	1,15ab	1,09ns	2,11ns	
Fe-EDDHA	1,14b	1,29	1,20	0,795cb	1,11b	1,10	2,07	
Aquamato	1,28b	1,35	1,31	0,920ab	1,21a	1,11	2,04	
2*Aquamato	1,30a	1,40	1,28	0,975a	1,24a	1,11	2,19	
Doliron	1,30a	1,47	1,36	0,732c	1,22a	1,10	2,11	
2*Doliron	1,32a	1,42	1,21	0,952ab	1,23a	1,13	2,09	

<M>\* Representa las medias entre muestreos.

También se reseñan en la tabla 47 las concentraciones foliares de P y K. En la temporada 94/95, el primero de ellos mostraba valores elevados (intervalo de normalidad según Jones y col. (1991) de 0,17-0,3 %) pero sin alcanzar niveles tóxicos. No se encontraron diferencias significativas respecto al contenido en P, mientras que en la temporada 95/96, los niveles de este elemento descendieron respecto de la temporada

## VI Validación agronómica de los productos

anterior, encontrándose dentro de los límites bajos, pero sin deficiencia. En esta ocasión todos los tratamientos férricos incrementaron significativamente los niveles de éste elemento respecto del control, sin existir diferencias significativas entre tratamientos.

El K se vio afectado por la aplicación de los humatos en la temporada 94/95, los tratamientos incrementaron los niveles de K foliar, mostrando diferencias significativas con relación al Fe-EDDHA y al control. Sin embargo, en la temporada siguiente no se encontraron diferencias en los contenidos foliares de este macronutriente. Los niveles de este elemento aunque elevados, no se encontraban entre los considerados tóxicos.

**Tabla 48** Concentraciones foliares de Ca y Mg ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  m.s.) en el ensayo de campo, Bétera. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

<i>Citrus v. Navelina</i>								
	94/95					95/96		
Ca	I	II	III	IV	<M>	I	II	<M>
Control	2,48ns	2,80ns	5,54ns	5,41ns	3,99ab	2,01ns	4,17a	3,09c
Fe-EDDHA	2,07	3,04	5,32	5,22	3,91ab	2,25	5,13a	3,69a
Aquamato	2,36	3,00	5,41	5,18	3,99ab	2,15	5,11a	3,63ab
2*Aquamato	2,21	3,20	5,64	4,82	3,95ab	2,09	4,76ab	3,43abc
Doliron	1,92	2,60	5,11	5,43	3,76b	1,98	4,48ab	3,23bc
2*Doliron	2,26	3,12	5,65	5,51	4,13a	1,98	4,77ab	3,38bc
Mg								
Control	0,145ns	0,153ns	0,225ab	0,176b	0,175bc	0,16 ns	0,441ab	
Fe-EDDHA	0,137	0,166	0,198b	0,177ab	0,170b	0,156	0,435ab	
Aquamato	0,145	0,191	0,215ab	0,180ab	0,182abc	0,165	0,425bc	
2*Aquamato	0,138	0,179	0,214ab	0,172b	0,176abc	0,156	0,392c	
Doliron	0,139	0,203	0,241a	0,183ab	0,192ab	0,169	0,471a	
2*Doliron	0,152	0,123	0,240a	0,199a	0,193a	0,166	0,474a	

\*<M> Representa las medias entre muestreos.

Con relación a la influencia de los tratamientos sobre las medias de los muestreos del Ca foliar, en la tabla 48 no se observa la misma tendencia los dos años, si bien los niveles encontrados superan los máximos de referencia indicados por Jones y col. (1991), ( $>2,5\%$ ). En un principio, el tratamiento Doliron aplicado en dosis dobles fue el que

## VI Validación agronómica de los productos

mayores beneficios aportó a este macronutriente. Sin embargo, no se obtienen diferencias significativas importantes, exceptuando para la dosis normales de este mismo producto. El segundo año, todos los tratamientos incrementaron los niveles de Ca foliar sobre el control, siendo las diferencias mayores para el Aquamato férrico y el Fe-EDDHA con relación a los árboles no tratados. El Doliron aparece en último lugar, con niveles de este elemento próximos a los del control. A pesar de que los árboles fueron cultivados en suelos calizos, altos pH del suelo y la competencia con otros metales puede reducir la concentración de Ca en los cultivos. En este caso el incremento en la concentración de Ca respecto de los controles debe ser considerado como un efecto deseable de los tratamientos férricos.

En la tabla 48, se confirma la tendencia del Doliron para mejorar los niveles de Mg durante estos dos años, pero no se observaron diferencias significativas entre ambas dosis. Respecto al Aquamato férrico, se observa una tendencia incrementadora en un primer año, pero el segundo año aparecen los niveles más bajos. Los niveles de este elemento con relación a los de referencia dados por Jones y col. (1991) eran bajos el primer año (0,16-0,25%) y suficientes el siguiente (0,26-0,69 %).

### *B) Micronutrientes*

Con relación a los niveles de Fe foliar se observa un comportamiento estadístico diferente en los dos años que duró este ensayo. En la temporada 94/95 existió interacción tratamiento x muestreo, por lo que se estudiaron los niveles de este elemento en cada muestreo. En la siguiente temporada esto no ocurre, por lo que los resultados se expondrán como media de los muestreos. No se observan diferencias entre bloques.

El primer año, la tendencia del Fe no queda muy definida. En la tabla 49 se recoge la concentración de este elemento en las dos temporadas que duró el ensayo y en cada uno de los muestros realizados. Sólo aparecen diferencias significativas entre tratamientos en los muestreos tercero y cuarto. Si parece claro que cuando el Doliron se aplica en doble dosis no es el tratamiento más apropiado para incrementar los niveles de este micronutriente. En el segundo año se manifiesta que tanto las dosis dobles como las normales de Aquamato férrico fueron las más efectivas para incrementar los niveles foliares.



## VI Validación agronómica de los productos

de Fe en cítricos, aunque solamente se encontraron diferencias significativas en aquellos árboles que fueron tratados con dobles dosis de Aquamato férrico, confirmandose otra vez el Doliron en dobles dosis como el más negativo. Aunque en los dos años que duró el ensayo los árboles mostraron niveles foliares bajos de este micronutriente respecto a los niveles proporcionados por Jones y col. (1991) ( $39\text{--}59\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), en ningún caso se observó deficiencia de Fe. Un factor que debe ser tenido en cuenta a la hora de valorar estos niveles tan bajos de Fe es el lavado a que se sometió el material vegetal. Éste era necesario por tratarse de muestras de campo, que habían sido tratadas con diferentes aplicaciones foliares, y de esta forma se aseguraba la eliminación de cualquier elemento externo que pudiera falsear el análisis foliar. Otros autores no realizan lavados tan exhaustivos, por lo que la comparación con la normalidad es bastante difícil.

**Tabla 49** Concentración foliar de Fe y Mn en el ensayo de Bétera. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas.

Citrus v. Navelina							
	94/95				95/96		
Fe ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ P.S.)	I	II	III	IV	I	II	<M>
Control	43,7ns	38,5bc	57,0ns	69,8a	28,5ns	65,3ab	46,9b
Fe-EDDHA	38,2	58,8ab	55,5	61,2ab	31,4	66,8ab	49,1ab
Aquamato	47,5	57,2ab	56,9	56,8b	32,8	68,7ab	50,7ab
2*Aquamato	45,2	64,4a	54,1	58,9ab	32,7	75,2a	53,9a
Doliron	49,6	41,0bc	59,4	63,6ab	34,0	73,2ab	53,6a
2*Doliron	42,0	31,0c	55,1	56,9b	29,9	62,8b	46,3b
Mn ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ P.S.)							
Control	12,4a	32,3ns	27,0b	31,6ns	69,2ns	66,5ab	67,8ns
Fe-EDDHA	12,1a	31,0	36,2ab	32,9	92,8	57,7b	75,3
Aquamato	10,8ab	25,9	30,7ab	26,9	90,1	64,2ab	77,2
2*Aquamato	11,7ab	31,3	31,8ab	33,7	87,9	72,5a	80,2
Doliron	9,82b	33,9	28,4b	31,4	82,5	64,2ab	73,4
2*Doliron	11,7ab	29,1	39,1a	29,3	75,6	65,2ab	70,0

<M> Representa las medias entre muestreo.

## VI Validación agronómica de los productos

En el caso concreto del Mn, igual que el Fe, se obtiene interacción tratamiento muestreo el primer año, por lo que se realizó su estudio estadístico por muestreos independientes recogido en la tabla 49. Sólo, se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el primer y tercer muestreo. En el primero de ellos, todos los árboles presentaban deficiencia de Mn, pero se recuperaron en el siguiente muestreo como consecuencia de la aplicación foliar de este micronutriente como  $\text{MnSO}_4$ , alcanzándose niveles suficientes al final del ensayo ( $25\text{-}200 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ). No se manifiesta un efecto directo de los tratamientos, a excepción de la dosis simple de Doliron con la que no se alcanzan niveles óptimos de Mn foliar. En el segundo año, no aparecen diferencias significativas entre tratamientos, aunque si se observó una influencia no deseable de los bloques sobre los resultados. Sin embargo, puede verse que los tratamientos incrementaron este elemento con relación al tratamiento control. Las dosis normales de Doliron aparecen de nuevo como las que menos favorecieron este incremento.

**Tabla 50** Concentración foliar de Cu y Zn ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) en el ensayo de Bétera. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

Citrus v. Navelina								
	94/95					95/96		
Cu	I	II	III	IV	<M>	I	II	<M>
Control	16,1ns	11,3ns	8,12ab	7,40ns	10,7ab	17,5ns	7,40ns	12,5ns
Fe-EDDHA	17,9	12,5	8,30ab	8,25	11,7a	17,1	7,15	12,1
Aquamato	16,9	12,0	8,42ab	7,05	10,8ab	19,8	7,85	13,8
2*Aquamato	14,5	10,6	7,12b	7,48	10,0b	17,9	8,17	13,0
Doliron	16,9	11,0	9,62a	8,32	11,5a	17,9	7,42	12,7
2*Doliron	16,4	11,5	9,05ab	7,15	11,0ab	17,1	8,00	12,6
Zn								
Control	26,4ns	53,6ns	49,1c	47,3ns	44,1b	76,1ns	60,4ab	68,3ns
Fe-EDDHA	25,6	57,2	72,8ab	50,5	51,5ab	90,7	59,3ab	75,0
Aquamato	24,4	49,0	63,0cb	44,4	45,2b	84,5	65,0ab	74,7
2*Aquamato	26,4	58,8	85,6a	47,7	56,6a	77,5	53,1b	65,3
Doliron	23,1	51,3	73,6ab	52,4	50,1ab	75,8	60,4ab	68,1
2*Doliron	25,6	57,1	71,2ab	44,9	49,7ab	75,7	60,5ab	68,1

<M> Representa las medias entre muestreo.

## VI Validación agronómica de los productos

Las medidas de Cu total correspondientes al ensayo actual y descritas en la tabla 50, denotan que este micronutriente se comportó de forma similar al constatado en el ensayo de invernadero para la variedad del grupo Navel. Incrementándose sus niveles en todos los tratamientos férricos con relación al control en la temporada 94/95, excepto en el caso del Aquamato férrico. Estos resultados, sin embargo, no se confirman el segundo año. No se considera, por tanto, que conste influencia de los tratamientos sobre el nivel de este micronutriente. Con relación a los valores de referencia de Jones y col. (1991) se mantuvo dentro de la suficiencia ( $5-16 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ )

Tampoco se obtuvieron niveles de Zn diferentes a los indicados como suficientes por Jones y col. (1991) y que están comprendidos entre  $25-100 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ . De acuerdo con los valores indicados en la tabla 50, no existe una influencia directa de los tratamientos sobre la concentración de este micronutriente, a excepción de las diferencias encontradas el primer año por el Aquamato férrico, que no se confirmaron al siguiente. Este efecto es diferente en función de la dosis. Las dosis dobles incrementaron los valores de este micronutriente significativamente respecto del control y las dosis normales de este mismo producto. Esto parece indicar que existe un efecto de la concentración sobre la movilización del Zn, que debe considerarse a efectos de toxicidad, aunque no se confirma en el segundo año.

### *2.1.2.4 Índices de nutrición férrica.*

En el primer año de ensayo las relaciones entre elementos utilizadas para valorar el estado férrico de la planta no presentaron las mismas tendencias, pues existe desacuerdo en su comportamiento. En las figuras 53 a 57 aparecen los índices Fe/Mn, N/Ca y  $50(10P+K)/\text{Fe}$  que están siendo utilizados en este trabajo como índices de nutrición férrica en cítricos.

Durante el primer año de experiencia, la relación Fe/Mn, recogida en la figura 53, se incrementa en las aplicaciones de Doliron efectuadas al inicio del ensayo, mientras que el efecto se aminora a la mitad de éste para mostrarse el Aquamato férrico como el más positivo. Los árboles tratados con dobles dosis de Doliron, también, presentaron los valores

## VI Validación agronómica de los productos

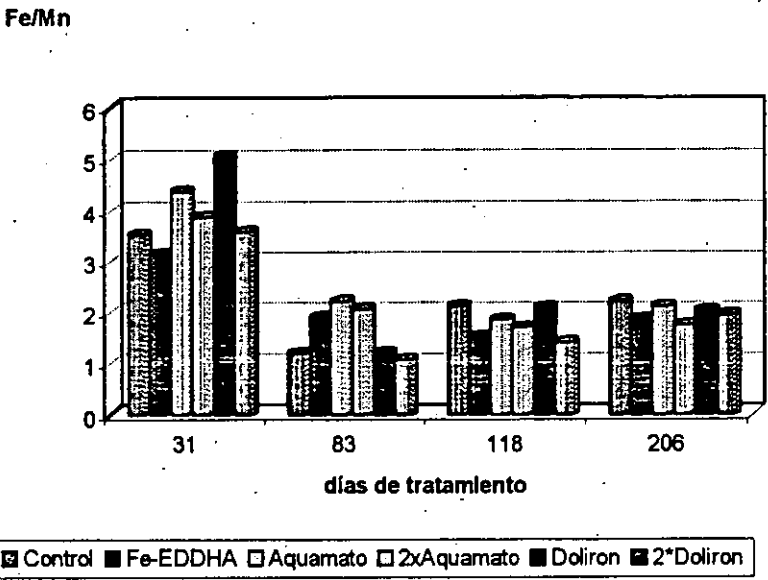
más bajos para las relaciones  $N/Ca$  y  $50(10 P+K)/Fe$  al final del ensayo como viene reflejado en las figuras 55 y 57. Hay que constatar que el control en este ensayo mostraba buenos niveles de este micronutriente, de hecho, sólo se observa aumento en la relación  $Fe/Mn$  a partir del segundo muestreo en los árboles controles y, como ya ha sido indicado en aquellos donde se aplicaron las dosis doble de Doliron.

En la temporada 95/96, no se percibe una mejora en los árboles tratados respecto de los controles, pero si se manifiesta una cierta armonía entre los resultados descritos por las relaciones entre elementos, como muestran las figuras 54, 56 y 58. Inicialmente, todos los tratamientos a excepción de las dosis dobles de Doliron mejoraron sus niveles férricos respecto a los controles, pero éstos se fueron igualando a medida que transcurría el ensayo. En esta temporada, como puede verse en la figura 54, es el Aquamato férrico el que más beneficia a la relación  $Fe/Mn$ , incluso hasta el final del ensayo. Similar comportamiento produce el Doliron, aunque en esta ocasión las dobles dosis de este último no revelan resultados tan óptimos como lo fueron en la temporada 94/95.

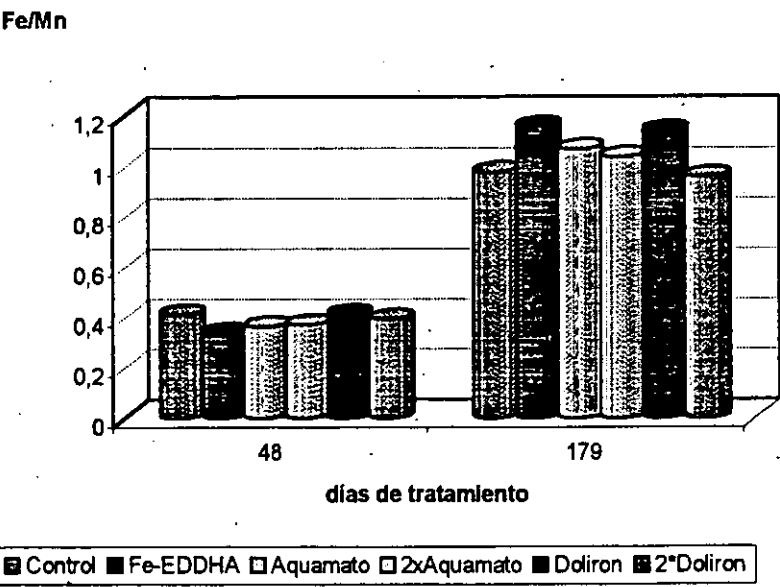
Las otras dos relaciones,  $N/Ca$  y  $50(10 P+K)/Fe$ , se muestran en las figuras 56 y 58 y mostraron tendencias similares. El tratamiento del Doliron en sus dosis dobles fué el más beneficioso en un primer momento, mientras que al final del ensayo las dosis dobles de Aquamato férrico revelaron mejores resultados.

VI Validación agronómica de los productos

**Figura 53** Relación Fe/Mn en *Citrus* vr Navelina cultivados en Bétera. Temporada 94/95



**Figura 54** Relación Fe/Mn en *Citrus* vr. Navelina cultivados en Bétera. Temporada 95/96.



VI Validación agronómica de los productos

Figura 55 Relación N/Ca en Citrus vr. Navelina cultivados en Bétera. Temporada 94/95

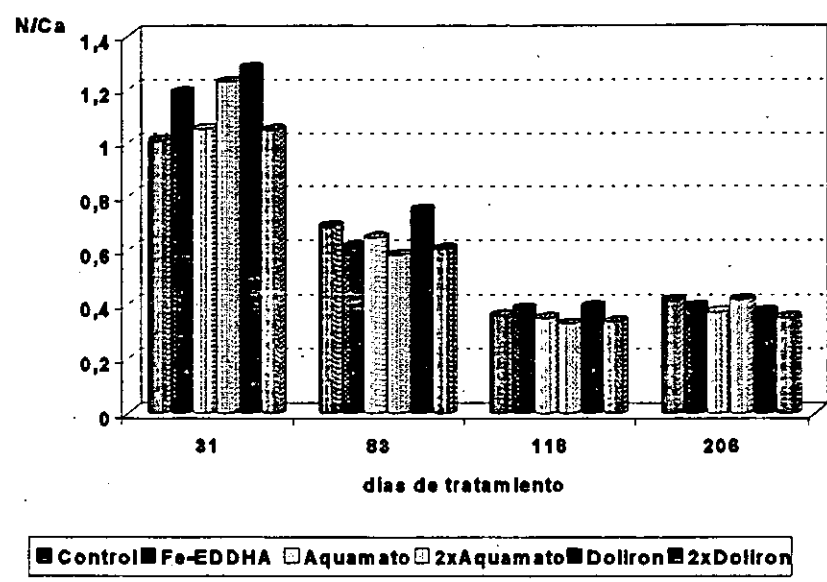
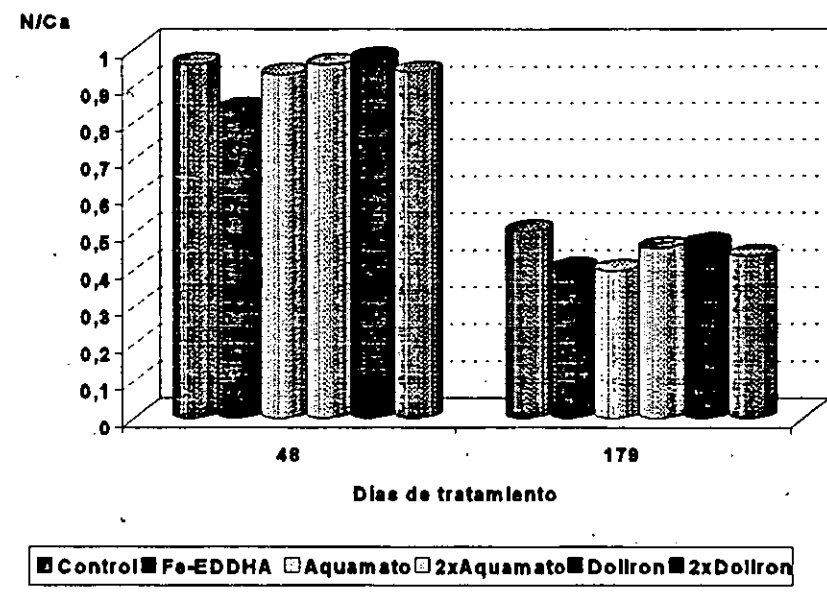
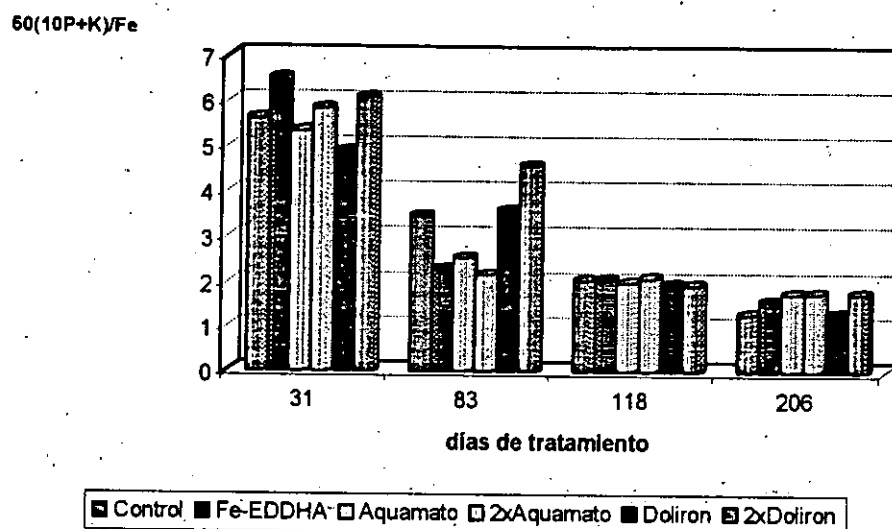


Figura 56 Relación FN/Ca en Citrus vr. Navelina cultivados en Bétera. temporada 95/96

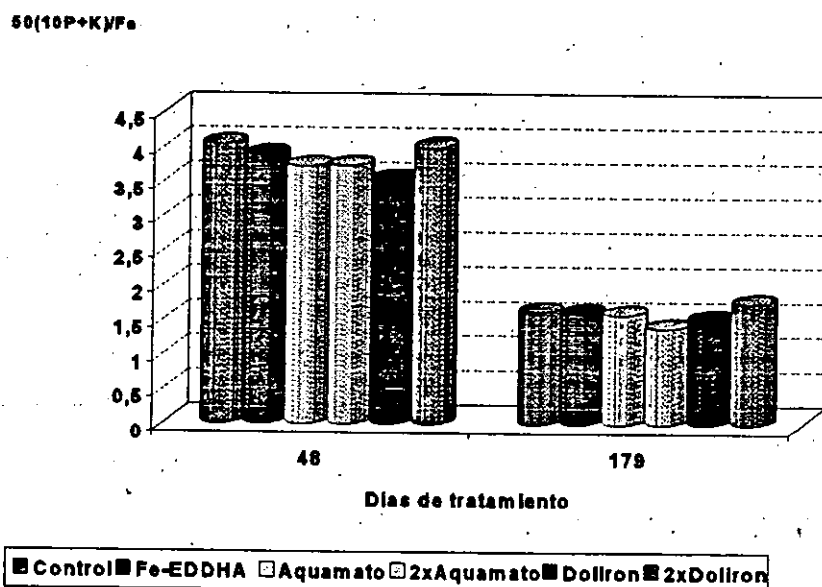


## VI Validación agronómica de los productos

**Figura 57** Relación  $50(10P+K)/Fe$  en *Citrus* vr. Navelina cultivados en Bétera. Temporada 94/95.



**Figura 58** Relación  $50(10P+K)/Fe$  en *Citrus* vr. Navelina cultivados en Bétera. Temporada 95/96.



## VI Validación agronómica de los productos

### 2.1.2.5. Análisis de fruto

#### *A) Producción y Calidad de fruto*

La eficacia de la fertilización ha de ser valorada en función de la producción y calidad del fruto. A este respecto se evaluó en la temporada 94/95 la producción de naranjas en Kg/árbol para cada tratamiento. La virosis que presentaron la mayoría de los árboles el segundo año desaconsejó la recolección, por lo que no se pudo conocer la incidencia de los tratamientos en esa época. Además de la producción, se analizaron otros parámetros de calidad de fruto como el calibre, y el peso de las naranjas.

En la tabla 51 se muestra la producción dada como Kg de naranjas por árbol y el peso y calibre de fruto para cada tratamiento. Los resultados indican que el tratamiento más efectivo fue la dosis doble de Doliron, aunque la diferencia no es significativa respecto el resto de los tratamientos al 95 % de probabilidad. Tampoco existen diferencias significativas en lo referente a los datos de peso y calibre de fruto, si bien todos los tratamientos férricos incrementaron estos valores respecto al control, a excepción del calibre en aquellos árboles que fueron tratados con dosis normales de Aquamato férrico.

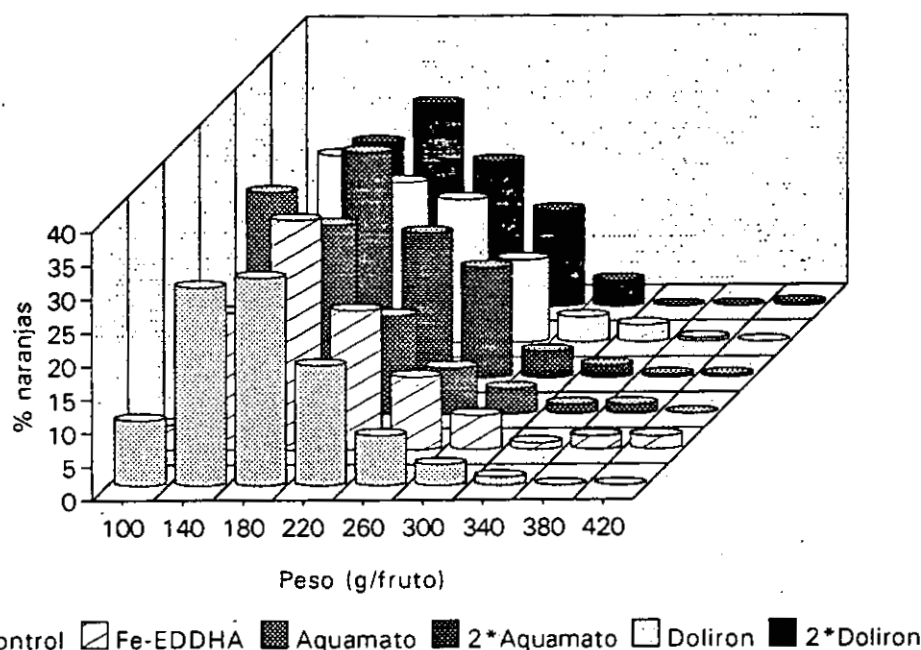
**Tabla 51** Producción y calidad del fruto obtenidos en el ensayo de Valencia durante la temporada 94/95

	Producción	Calibre medio	Peso medio de fruto
Control	121,5 n.s.	74,2 n.s.	191,5n.s.
Fe-EDDHA	129,5	75,1	213,9
Aquamato férrico	112,8	73,5	197,9
2* Aquamato férrico	127,2	75,9	210,7
Doliron	114,3	75,1	204,2
2*Doliron	140,2	75,1	203,4

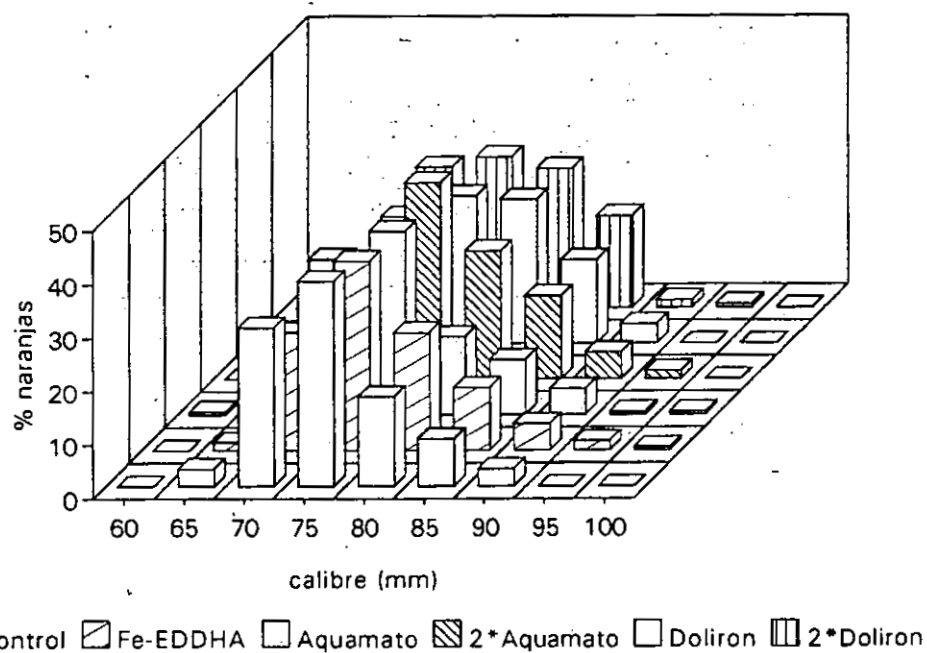
Es interesante analizar la distribución de estos dos últimos parámetros en función del porcentaje de naranjas, factible dado el gran número de unidades recogidas. Las figuras 59 y 60 describen el peso y el calibre de todas las naranjas muestreadas. Los tratamientos más rentables son aquellos que dan mayor porcentaje de naranjas con mayor tamaño, de acuerdo con las dos figuras se produce en las dosis dobles de los humatos férricos.



**Figura 59** Distribución del peso de naranja en el ensayo de Bétera, temporada 94/95.



**Fogura 60** Distribución del calibre de naranja en el ensayo de Bétera, temporada 94/95.



## VI Validación agronómica de los productos

### *B) Análisis de calidad de zumo*

La tabla 53 refiere el porcentaje total de zumo obtenido de las naranjas. No se obtuvieron diferencias significativas para este parámetro. También se evaluaron como índices de calidad organoléptica, el pH del zumo y su acidez valorable (expresada como porcentaje de ácido cítrico). Para ambos casos, el tratamiento que demostró pH más elevado fue el Doliron, cuando se aplicaba en dosis normales. El contenido en azúcares, expresado como grados Brix corregidos, es mayor en el tratamiento con Aquamato férrico que en el resto de los tratamientos, lo que indica que las naranjas procedentes de árboles tratados, tanto con dosis normales como dobles de Aquamato férrico, serían las más dulces.

Tampoco en esta ocasión los resultados son estadísticamente significativos. También se estudió el índice de maduración, relación entre contenido en azúcares y acidez valorable. Este índice fue más favorable a las dosis normales de Aquamato férrico y al Doliron, pero estadísticamente no fue significativo.

**Tabla 52** Análisis de la calidad del zumo.

	Porcentaje de zumo (% p/V)	Densidad (g/L)	pH	acidez valorable	Ácido ascórbico	BRIX	I.M.
Control	37,05ns	1,059ns	3,37ns	1,72n.s	0,077ns	12,60ns	7,46ns
Fe-EDDHA	38,37	1,046	3,42	1,57	0,065	12,80	8,47
Aquamato	37,44	1,051	3,35	1,72	0,068	13,22	7,73
2*Aquamato	36,91	1,043	3,44	1,64	0,071	12,34	7,50
Doliron	36,97	1,045	3,36	1,63	0,077	13,02	8,34
2*Doliron	34,74	1,044	3,40	1,65	0,074	12,97	7,98

\* I.M. Índice de madurez

#### *2.1.2.6. Resumen de resultados*

En síntesis, respecto de los ensayos de campo sobre cítricos, puede afirmarse que:

## VI Validación agronómica de los productos

► De un lado, en el ensayo de campo sobre Citrus *vr* Navelina se ha observado que el Doliron en dosis dobles produjo un incremento significativo del peso seco de la hoja en dos de los cuatros muestreos realizados en la temporada 94/95, que se corresponden con el momento de la floración y del engorde de fruto. El primero sólo presenta diferencias significativas con las dos aplicaciones de Aquamato férrico pero no con el resto de los tratamientos; mientras que en el momento correspondiente al engorde del fruto aquellas sólo existen respecto al quelato sintético. En ninguno de estos dos muestreos se produjeron diferencias significativas entre tratamientos, con respecto a los contenidos foliares de Fe, ni en el índice SPAD.

► Por otro lado, en el momento de la floración, aquellos árboles que mostraron los mejores rendimientos en el peso seco de la hoja es decir, los tratados con dobles dosis de Doliron, y Fe-EDDHA, no parecen presentar un mejor nivel de ningún nutriente en especial. De hecho, las tendencias mostradas por los elementos en el primer ensayo no se correlacionan con la influencia de los tratamientos sobre el peso seco. Únicamente cabe destacar que el posible efecto de dilución de nutrientes, consecuencia del mayor crecimiento, propiciado por la dosis dobles de Doliron, sólo parece afectar a los contenidos foliares de N, que reflejaron los valores más bajos. Las relaciones entre elementos que más favorecieron el estado férrico de la planta tampoco se manifestaron especialmente positivos. Como consecuencia, el efecto del Doliron sobre el aumento del peso seco de la hoja no cabe atribuirlo exclusivamente a la mejora en la nutrición mineral de la planta.

► Asimismo, el análisis mineral de la hojas de cítricos correspondientes al periodo de engorde del fruto (tercer muestreo) presenta características similares al de floración, con excepción de las concentraciones de Cu, Mn, Zn y Mg que se ven favorecidas en las aplicaciones de Doliron, mientras que las de N continúan bajas. Con relación al contenido de Fe foliar no se observan diferencias significativas entre tratamientos, aunque se incrementa el índice SPAD de la hoja.

► Por lo que se refiere al último muestro en el momento de maduración del fruto, se apreciaba un efecto de los tratamientos sobre el Fe, aunque no en el resto de los micronutrientes. Mereciendo destacarse que, como consecuencia del tratamiento de dosis

## VI Validación agronómica de los productos

dobles de Doliron, se favorece especialmente la asimilación de macronutrientes, excepto del N. A pesar de los elevados contenidos de K no se aprecian problemas de asimilación de Ca y Mg, siendo éste, cómo se ha indicado en la descripción de los resultados, el elemento más favorecido en estas aplicaciones.

► Por último, con relación a la situación nutricional de los árboles en la temporada siguiente, los controles presentan un contenido de Fe foliar inferior al resto de los tratamientos, aunque no es significativo hasta el final del ensayo. El mismo comportamiento se observa con el resto de los elementos, siendo en el segundo muestreo donde mayores son las diferencias. Los parámetros evaluados con relación al crecimiento también confirman el efecto beneficioso del Doliron en dosis dobles, pero con mayor incidencia en peso fresco que en peso seco, al mismo tiempo que el Aquamato férrico, aunque mejoró notablemente los contenidos de Fe foliar y el índice SPAD de la hoja, dio lugar a los menores rendimientos en peso fresco de hoja. En este segundo año de experiencia no se reflejó acumulación elevada de micronutrientes en aquellos árboles que fueron tratados con los humatos. Respecto a los macronutrientes, la acción de los tratamientos se manifiesta de nuevo, fundamentalmente al final del ensayo, confirmandose la tendencia del año anterior. Hubiera sido interesante prolongar el estudio un año más a fin de conocer el efecto acumulativo de los tratamientos, sin embargo, debido a la viriosis no se estimó procedente este último estudio.

### **2.2. EVALUACIÓN SOBRE MELOCOTONEROS**

El ensayo sobre melocotoneros se realizó en la temporada 95/96 en la provincia de Lleida, en concreto en la localidad de Sudanell. Este área, además de destacar por la calidad de los frutos, es una zona de suelos calizos y muy sensible a la clorosis férrica. Entre los fertilizantes de uso obligatorio, se encuentran los quelatos sintéticos ampliamente extendidos dada la naturaleza del suelo y la rentabilidad del cultivo.

El análisis de la varianza se incluye en el disquete adjunto, en el directorio "Lleida". A continuación se comentarán los resultados, tanto en cuanto a los parámetros de

## VI Validación agronómica de los productos

crecimiento, como respecto del análisis mineral y de producción y calidad de fruto.

### 2.2.1 Parámetros de crecimiento

El ensayo de campo en melocotoneros se realizó en la temporada 95/96 al mismo tiempo que la segunda parte del ensayo de Valencia. Anteriormente se expusieron los criterios empleados para elegir los parámetros de crecimiento con especial referencia al área de superficie foliar, dadas las diferencias entre los tamaños foliares que habían surgido en el primer año de la experiencia en cítricos, y que se dan aquí por reproducidos.

**Tabla 53** Valores del grosor foliar, área foliar y peso seco para cada tratamiento y muestreo en hojas de melocotonero, Lleida 1995/96. Letras diferentes en una misma columna denotan diferencias significativas según el Test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

	I	II	<M>*
<b>Grosor foliar (mg P.F.·cm<sup>-2</sup>)</b>			
Control	5,19 n.s.	5,09 n.s.	5,14 n.s.
Fe-EDDHA	5,11	5,49	5,30
Aquamato férrico	4,99	5,29	5,14
2*Aquamato férrico	4,97	5,29	5,13
Doliron	5,10	4,98	5,04
2*Doliron	5,22	5,09	5,15
<b>Área foliar (cm<sup>2</sup>·hoja<sup>-1</sup>)</b>			
Control	34,7 n.s.	33,2 n.s.	34,0 n.s.
Fe-EDDHA	38,5	36,0	37,3
Aquamato férrico	37,1	32,5	34,8
2*Aquamato férrico	36,8	32,7	34,7
Doliron	35,6	35,4	35,5
2*Doliron	35,4	35,3	35,3
<b>Peso seco (gr·hoja<sup>-1</sup>)</b>			
Control	0,179 n.s.	0,166 b	0,173 b
Fe-EDDHA	0,197	0,197 a	0,197 a
Aquamato férrico	0,185	0,172 b	0,179 b
2*Aquamato férrico	0,182	0,177 b	0,177 b
Doliron	0,182	0,172 b	0,177 b
2*Doliron	0,184	0,179 b	0,182 b

\*<M> Representa las medias entre muestreos

## VI Validación agronómica de los productos

En el caso concreto del análisis foliar de melocotón se desechó el peso fresco como indicador de crecimiento, habida cuenta que las hojas se pesaron en el laboratorio y no se mantenían en perfectas condiciones, no obstante haberse conservado en frío.

El tratamiento estadístico de los resultados denotó que la interacción tratamiento x muestro no era significativa. A pesar de ello, junto con el valor medio de ambos muestreos se expresarán los valores para cada uno de los efectuados, a fin de conocer la evolución de cada parámetro en los distintos momentos del cultivo. En la tabla 53 se recogen los valores para el grosor, área y peso seco de las hojas muestreadas en el ensayo de Lleida.

Como puede observarse, no se obtienen diferencias significativas entre tratamientos, ni para el área foliar, ni para el grosor, pero en el área foliar son los árboles control los que presentan menores valores. Por el contrario, sí se manifiestan claras diferencias en los datos correspondientes al peso seco, donde a partir del segundo muestreo el tratamiento Fe-EDDHA incidió positivamente en el incremento de este parámetro.

### 2.2.2 Índice SPAD

Todos los árboles presentaron síntomas de clorosis al final del ensayo, excepto aquellos que fueron tratados con Fe-EDDHA que tenían las hojas más verdes. Con relación al Índice SPAD no se produjo interacción tratamiento x muestreo. La aplicación del test de Duncan a los valores medios experimentales, obtenida para cada tratamiento y muestreo y al resultado de la interacción tratamiento x muestreo, se

**Tabla 54** Valores del Índice SPAD obtenidos en hojas de *Prunus persica*. Letras diferentes denotan diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

	I	II	<M>
Control	30,9 bc	25,7 b	28,3 b
Fe-EDDHA	38,2 a	34,5 a	36,4 a
Aquamato	31,9 b	26,8 b	29,3 b
2*Aquamato	27,6 c	21,3 c	24,5 c
Doliron	31,0 bc	26,1 b	28,6 b
2*Doliron	32,9 b	23,7 b	28,3 b

<M> Representa las medias entre muestreo.

recogen en la tabla 54.

## VI Validación agronómica de los productos

Los resultados presenta diferencias significativas desde la realización del primer muestreo, correspondiendo los valores más elevados del índice SPAD a aquellos árboles tratados con el Fe-EDDHA, mientras que las dobles dosis del Aquamato férrico presentaron los valores más bajos.

### **2.2.3 Análisis mineral**

#### *A) Macronutrientes*

Los niveles de macronutrientes totales obtenidos en el análisis foliar para melocotoneros se indican en la tablas 55 y 56. Del estudio de la tabla 55 se deduce que la aplicación de los tratamientos no afectó a la concentración de P, pero si lo hizo al resto de los elementos.

Los valores encontrados para el K son elevados (Casero, 1985) y se vieron afectados principalmente por la aplicación al suelo de las dosis dobles del Aquamato férrico. Este efecto se incrementó a lo largo del ensayo, como se refleja en la tabla 55. Por último, hay que resaltar la influencia positiva de las dosis dobles de Doliron respecto de los niveles de N que presentan un incremento significativo.

La aplicación del Análisis de la varianza a los resultados correspondientes a la concentración de Ca foliar reveló la existencia de una interacción significativa *tratamiento x muestreo*, que ya se había manifestado en los ensayos de cítricos realizados en invernadero. Tanto en la variedad Lane Late, como en la variedad Satsuma los niveles de Ca en hoja descendían del segundo al tercer y último muestreo, siendo el tratamiento que peor resultados producía. En el ensayo que nos ocupa la concentración de Ca, tabla 56, se incrementó en todos los tratamientos a medida que se desarrollaba temporalmente, siendo la aplicación de Aquamato férrico la más efectiva. Parece oportuno subrayar que todos los tratamientos influyeron en la misma medida en un primer momento. Las diferencias entre tratamientos se incrementaron en el segundo muestreo, especialmente entre los tratamientos más efectivos, Aquamato férrico y control, y el Fe-EDDHA, que se manifestó como el que aportó menor nivel de Ca al cultivo.

## VI Validación agronómica de los productos

El Doliron que había sido el tratamiento más eficaz para incrementar los niveles de Mg no manifiesta en las actuales condiciones de cultivo un comportamiento análogo, como puede verse en la tabla 56. En esta ocasión, todos los tratamientos en los que los humatos férricos se encontraban involucrados mejoraron los niveles de este macronutriente, siendo estas diferencias significativas en el segundo muestreo.

**Tabla 55** Concentración foliar de N, P, y K ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  m.s.) en melocotoneros. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ )

Prunus			
N	I	II	<M>
Control	3,02 ab	2,28 b	2,65 b
Fe-EDDHA	2,96 ab	2,33 b	2,65 b
Aquamato	2,91 b	2,40 ab	2,66 b
2*Aquamato	3,06 ab	2,47 ab	2,77 ab
Doliron	2,88 b	2,37 ab	2,62 b
2*Doliron	3,15 a	2,62 a	2,89 a
P			
Control	0,243 n.s.	0,152 n.s.	0,200 n.s.
Fe-EDDHA	0,252	0,154	0,205
Aquamato	0,275	0,175	0,216
2*Aquamato	0,256	0,157	0,207
Doliron	0,259	0,160	0,209
2*Doliron	0,250	0,168	0,209
K			
Control	2,94 ab	2,63 b.	2,790b
Fe-EDDHA	2,59 b	2,69 b	2,644b
Aquamato	2,74 b	2,70 b	2,721b
2*Aquamato	3,45 a	3,46 a	3,456a
Doliron	2,76 b.	2,93 ab	2,844b
2*Doliron	2,81 ab	2,98 ab	2,894b

<M> Representa las medias entre muestreo.

Todos los macronutrientes presentaban valores suficientes de acuerdo con los intervalos dados para el *Prunus persica* var Sudanell por Casero (1985), con excepción de



## VI Validación agronómica de los productos

la concentración de K encontrada en aquellos árboles que fueron tratados con Aquamato férrico, que puede considerarse elevada. Las altas cantidades de este macronutriente pueden causar desequilibrios con relación a la concentración de Ca y Mg para este tratamiento. Si bien la concentración de Mg, se presenta dentro de los niveles suficientes, esto no ocurre con la concentración de Ca, que como puede verse en la tabla 56, alcanza niveles mayores que los considerados elevados por Jones y col. (1991) y Casero (1985).

**Tabla 56** Concentración foliar de Ca y Mg ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  m.s.) en melocotoneros (Lleida). Letras distintas en la misma columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

Ca	I	II	
Control	1,91 n.s.	3,50 ab	
Fe-EDDHA	1,89	2,91 c	
Aquamato	1,98	3,67 a	
2*Aquamato	1,82	3,05 bc	
Doliron	1,80	3,24 abc	
2*Doliron	1,85	3,09 bc	
Mg	I	II	<M>
Control	0,491 n.s.	0,829 ab	0,660 bc
Fe-EDDHA	0,494	0,756 b	0,625 c
Aquamato	0,532	0,922 a	0,727 a
2*Aquamato	0,522	0,851 ab	0,687 a
Doliron	0,506	0,846 ab	0,676 ab
2*Doliron	0,508	0,855 ab	0,682 ab

<M> Representa las medias entre muestreo.

### *B) Micronutrientes*

El análisis de la varianza de los micronutrientes totales, analizados en hojas de melocotoneros, denotaron la existencia de un efecto de los tratamientos sobre los muestreos, cuando éste se aplicó a las concentraciones totales de Fe y Mn, efecto que ya había sido evidenciado en el ensayo de cítricos. Por el contrario, no se encontró interacción tratamiento x muestreo en las concentraciones de Cu y Zn.

## VI Validación agronómica de los productos

La tabla 57 describe la concentración de Fe y Mn para cada tratamiento y muestreo. Al respecto conviene recordar que el melocotón es un cultivo muy sensible a las deficiencias

**Tabla 57** Concentración foliar de Fe y Mn ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  m.s.) en melocotoneros. Letras diferentes denotan diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

Fe	I	II
Control	40,6bc	42,7c
Fe-EDDHA	52,0a	63,1a
Aquamato	42,0b	53,1b
2*Aquamato	34,8c	51,9bc
Doliron	38,5bc	53,8b
2*Doliron	41,4b	47,0bc
<b>Mn</b>		
Control	43,1 n.s.	46,9 bc
Fe-EDDHA	36,1	33,5 c
Aquamato	45,8	58,4 ab
2*Aquamato	36,9	67,6 a
Doliron	35,5	41,6 bc
2*Doliron	40,4	53,6 ab

de Fe y en la zona de desarrollo de la experiencia la clorosis férrica es frecuente. Por este motivo, la aplicación de quelatos sintéticos para paliar esta deficiencia es una práctica habitual y muy extendida. La medidas de Fe foliar obtenidas ponen de manifiesto que los quelatos sintéticos son, sin lugar a dudas, el mejor tratamiento a fin de incrementar los contenidos de este micronutriente, manteniéndose este efecto hasta el final de la experiencia. Sí se observó que, a medida que transcurría la temporada, el resto de los tratamientos férricos incrementaron los niveles de Fe foliar significativamente respecto del control, especialmente al final del ensayo.

Todos los árboles, incluidos aquellos en los que había sido aplicado el Fe-EDDHA, presentaban valores de Fe inferiores a los descritos por Jones y col. (1991) como bajos contenidos, esto puede ser consecuencia del agresivo lavado al que fueron sometidas las muestras a fin de minimizar la contaminación externa. Los niveles de Fe mejoraron en todos los tratamientos férricos, y fundamentalmente en las aplicaciones del quelato sintético. Con relación a los fulvatos férricos, de nuevo se observa el efecto beneficioso de las dosis normales en el primer muestreo, manteniéndose así a medida que transcurre el tratamiento. Las dosis dobles presentan un mayor carácter residual.

Tampoco se observan niveles bajos o ligeramente suficientes de Mn. En un primer momento no se produjeron diferencias significativas entre los tratamientos, manifestándose en el segundo muestreo un antagonismo con los niveles de Fe. Este efecto sobresale en las

## VI Validación agronómica de los productos

aplicaciones del quelato sintético y en las dosis normales de Doliron. Sin embargo, no se evidencia en aquellos árboles que fueron tratados con Aquamato férrico, con independencia de cual fuera la dosis utilizada. De hecho, los resultados expuestos en la tabla 57 indican que estos tratamientos fueron los más eficaces para incrementar la concentración de este micronutriente. Si bien la utilización de humatos no implica concentraciones de Fe superiores a las obtenidas por el quelato sintético, sí mantiene, no obstante el equilibrio entre este elemento y el manganeso.

En la tabla 58 pueden encontrarse las concentraciones de Zn y Cu foliares, y la aplicación del test de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ). Solamente la concentración del Zn se ve afectada por la aplicación de los tratamientos férricos.

**Tabla 58** Concentración foliar de Cu y Zn ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  m.s.) en melocotoneros. Letras distintas denotan diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ )

	I	II	<M>
<b>Cu</b>			
Control	11,41 n.s.	5,90 n.s.	8,66 n.s.
Fe-EDDHA	11,45	5,87	8,66
Aquamato	10,95	6,95	8,95
2*Aquamato	11,17	6,62	8,90
Doliron	11,50	6,75	9,12
2*Doliron	10,82	6,45	8,64
<b>Zn</b>			
Control	28,5 a	36,8 b	32,7 abc
Fe-EDDHA	25,1 ab	32,7 b	28,9 c
Aquamato	27,3 ab	40,0 ab	34,0 ab
2*Aquamato	22,4 b	40,3 ab	31,4 bc
Doliron	21,4 ab	40,2 ab	33,8 ab
2*Doliron	27,0 ab	47,5 a	32,3 a

<M> Representa las medias entre muestreos.

El Cu no se ve afectado por los tratamientos férricos, encontrándose los niveles de este elemento dentro de los considerados suficientes por Jones y col. (1991) y Casero

## VI Validación agronómica de los productos

(1985). Este último autor ya indicó la relativa importancia cuantitativa de este bioelemento con relación al equilibrio nutricional del *Prunus persica* vr. Sudanell.

En relación con el Zn, cabe afirmar que se encuentra dentro del rango considerado como suficiente (20-50 mg·Kg<sup>-1</sup>). Siendo importante incidir en el efecto que presentan las dosis dobles del Doliron. Este tratamiento incrementa los niveles de este micronutriente a niveles superiores al resto de los tratamientos.

### **2.2.4 Índices de nutrición férrica.**

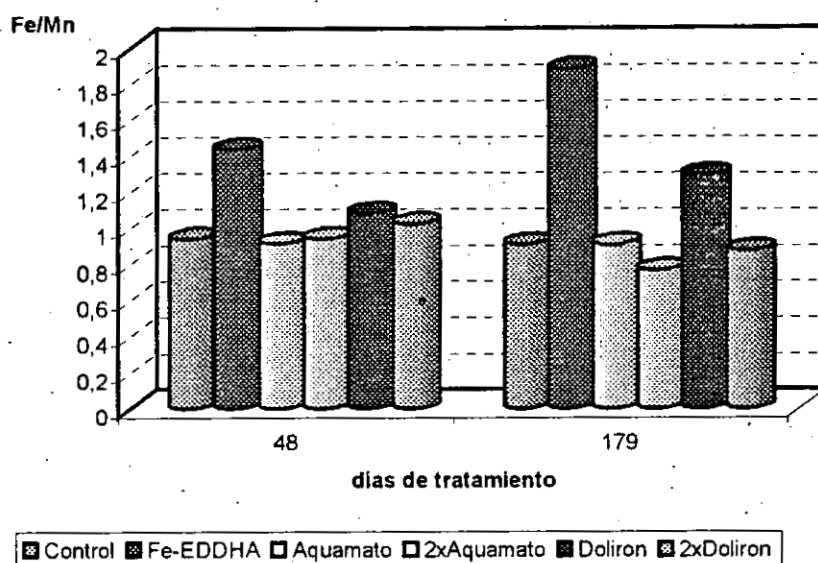
Entre las relaciones de elementos elegidas para estudiar el estado férrico de los melocotoneros, se encuentran las ya comentadas en los experimentos con cítricos, Fe/Mn y 50(10P+K)/Fe, y a ellas se incorpora la relación K/Ca. Esta última ha sido sugerida por Abadía y col (1986) y se correlaciona negativamente con el contenido de Fe foliar en melocotoneros. Las relaciones mencionadas se incluyen en las figuras 61 a 63. El quelato sintético se manifiesta como el tratamiento más eficaz para mejorar el estado férrico de hojas de melocotoneros. Así lo indican los elevados valores recogidos en la relación Fe/Mn, especialmente en el segundo muestreo (figura 61). La tendencia contraria es descrita por las otras dos relaciones, que disminuyen en las aplicaciones con Fe-EDDHA respecto del resto de los tratamientos y en los dos muestreos realizados, especialmente en la figura 62, correspondiente al índice 50(10P+K)/Fe.

También el Doliron, fué capaz de mejorar la situación férrica de los melocotoneros, de acuerdo con la elevada relación Fe/Mn, mostrada por este tratamiento sobre todo al final del experimento. Por otro lado, tanto la relación 50(10P+K)/Fe (figura 62), como la K/Ca (figura 63) confirmaron esta mejora, marcada por el descenso de estos índices.

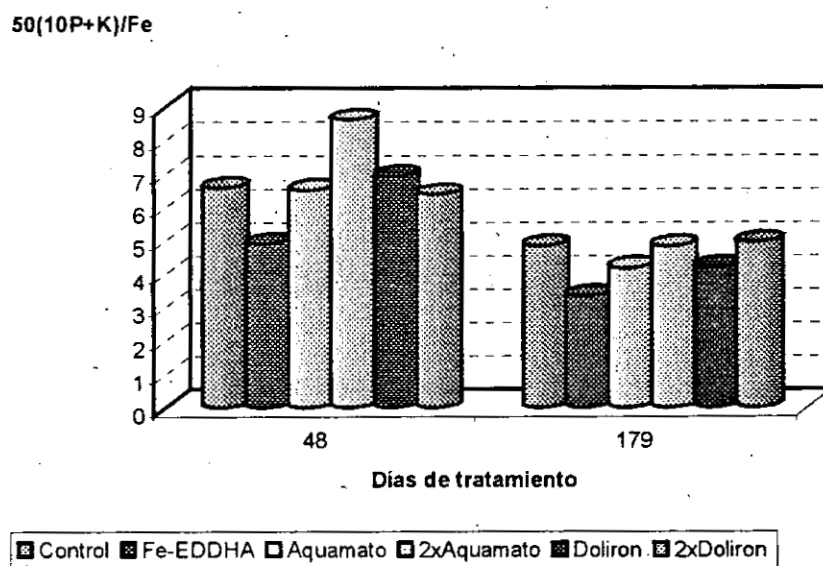
Los tratamientos que involucraban al Aquamato férrico no manifestaron efectos tan beneficiosos, con independencia de las dosis aplicadas. La relación Fe/Mn presenta valores próximos a los mostrados por los controles y en todo caso inferiores a los ya indicados para el quelato sintético y Doliron. Las otras dos relaciones reflejan valores que superan a estos los de estos últimos.

## VI Validación agronómica de los productos

**Figura 61** Relación Fe/Mn en *Prunus Persica* cultivados en Lleida.

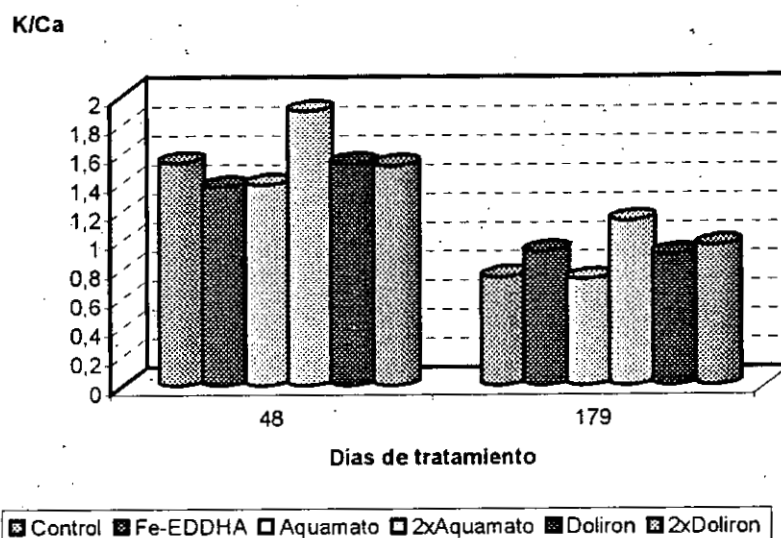


**Figura 62** Relación  $50(10P+K)/Fe$  en *Prunus Persica* cultivados en Lleida.



## VI Validación agronómica de los productos

**Figura 63** Relación K/Ca en *Prunus Persica* cultivados en Lleida.



### 2.5 Análisis de Fruto

**Tabla 59** Producción y calidad del fruto obtenido en el ensayo de Sudanel, Lleida, temporada 95/96. Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

	Producción (Kg-árbol <sup>-1</sup> )	Calibre (mm)
Control	75,1 abc	77,2 b
Fe-EDDHA	77,9 ab	80,6 a
Aquamato	88,7 a	77,4 b
2* Aquamato	59,0 d	74,5 c
Dolirón	68,1 bcd	77,1 b
2*Dolirón	62,1 cd	76,6 b

La incidencia de los tratamientos sobre la producción y calidad del fruto en el ensayo de Lleida se indican en la tabla 59, donde se presenta el peso de frutos recolectados por árbol y el calibre medio de fruto. Aquellos árboles que fueron inicialmente tratados con Aquamato férrico mediante dosis normales fueron los que más incrementaron la producción

## VI Validación agronómica de los productos

de melocotones. Esto es especialmente concluyente, dado que no existen diferencias significativas con el Fe-EDDHA, que, en principio, fue el tratamiento más eficaz para proporcionar Fe al cultivo. De otro lado, es digno de destacar que el rendimiento obtenido por los árboles a los que se aplicó este último quelato no difiere significativamente de los no tratados.

En el resto de los tratamientos los rendimientos fueron inferiores a la producción control, especialmente en el caso de empleo de las dosis dobles. Si bien las dosis normales de Aquamato férrico manifestaron los óptimos de producción, son las dosis dobles de este mismo producto las que menos rendimiento produjeron, decreciendo el total de Kg recogido en algo más del 21% respecto los controles.

Uno de los parámetros de calidad más valorado en el mercado del melocotón es el calibre del fruto, considerándose de primera calidad aquellos que presentan calibres superiores a 67 mm. El calibre medio de fruto obtenido para cada tratamiento superaba ese valor, si bien las diferencias encontradas en este parámetro son muy importantes. El Fe-EDDHA se manifiesta como el tratamiento que produjo un mayor calibre medio de fruto, y a excepción de las dosis dobles de Aquamato férrico, no se encontraron diferencias significativas entre el resto de los tratamientos. Se confirma de nuevo la menor productividad de aquellos árboles que fueron tratados con dosis dobles de Aquamato férrico, no sólo en cantidad sino también en calidad.

### **2.2.6 Resumen de resultandos**

En resumen, de la experiencia sobre melocotoneros se puede afirmar,

► Casero (1985) realizó un exhaustivo estudio sobre la nutrición del Prunus persica y Sudanell en condiciones de campo muy similares a las que fueron utilizadas en el ensayo cuyos resultados han sido aquí presentados. El autor resaltó el papel decisivo que ejercían el calcio y el zinc respecto de la producción, describiendo estos elementos una correlación claramente positiva en la cosecha. También, observó que el mayor rendimiento se encontraba asociado a los niveles de Fe y Mg más elevados en la primera mitad del ciclo,

## VI Validación agronómica de los productos

y mientras que, por el contrario tanto el nitrógeno como el potasio, deberían aproximarse a concentraciones medias. Es cierto que el análisis foliar en la experiencia realizada en este trabajo, para aquellos árboles donde se aplicó el tratamiento con Aquamato férrico, refleja un contenido de estos nutrientes muy próximos a los descritos por Casero (1985), y aunque los valores de potasio son elevados no existen problemas de asimilación de calcio, ni de magnesio. Ahora bien, el quelato sintético, aunque se da un peor balance de nutrientes, benefició al Fe al inicio del ensayo y mantuvo un mejor peso seco de hoja y una producción similar a la del Aquamato férrico, con una calidad de fruto superior. De ello se deduce la relevancia de la nutrición férrica en la producción del melocotón, pero siempre que la aplicación del Fe se lleve a cabo en el momento fenológico adecuado. En definitiva, si bien las dosis dobles de Aquamato férrico son apropiadas para incrementar los niveles foliares de este micronutriente, no lo son de forma suficiente como para obtener una mejora en la producción. Lo cual, posiblemente sea debido a que el incremento de Fe foliar se produce lentamente.

► De otro lado, a la vista de estos resultados, se aprecia que el efecto directo del Aquamato férrico sobre la absorción de nutrientes puede mejorar la calidad y cantidad del cultivo del melocotón. Esa incidencia positiva no sólo es debida a la presencia de Fe quelado fácilmente asimilable por la planta, sino que a ello contribuye también el balance de otros elementos fundamentalmente catiónicos como el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , y especialmente el  $\text{Zn}^{2+}$ . Dada la importancia del Fe en la producción de este cultivo, y a la vista del efecto residual, se aconsejaría que la aplicación del Aquamato férrico se ejecutara en el momento de la floración o incluso antes, y en posible combinación con bajas dosis de quelatos sintéticos, a fin de evitar las carencias de este micronutriente. Las dosis dobles del Aquamato férrico no son adecuadas dado que retardan en demasía la asimilación del Fe.



## 2.3 EVALUACIÓN SOBRE HORTÍCOLAS

De acuerdo con el criterio seguido en los anteriores ensayos vegetales, el tratamiento estadístico para la evaluación del Aquamato férrico, como sustrato alternativo en hortalizas cultivadas en invernaderos comerciales, se incluye en el disquete adjunto a la memoria. Los resultados correspondientes a plantas de pimiento, pepino y tomate se encuadran en los directorios así denominados. A continuación se describirán los resultados más relevantes para cada uno de los cultivos evaluados.

### 2.3.1. Resultados del pimiento.

#### 2.3.1.1. *Parámetros de crecimiento*

Tal como se señaló en el apartado de materiales y métodos de este capítulo, uno de los objetivos de este ensayo consistía en estudiar la influencia del Aquamato férrico mezclado con un sustrato orgánico sobre la germinación y desarrollo de plántulas. A tal fin se realizaron tres ensayos, el primero de los cuales, cuyos resultados se describirán a continuación, corresponde a plantas de pimiento.

El efecto de las sustancias húmicas sobre la germinación y desarrollo de plántulas ha sido ampliamente estudiado (Smidova, 1962; Dixit y Kishore, 1967; Iswaran y Chonkar, 1971) admitiéndose su influencia tanto en el crecimiento, como en el rendimiento final.

Uno de los datos más relevantes de este ensayo fue el número de plántulas con cotiledones desarrollados a los 15 días de la siembra. El tratamiento 50:50 no mostraba ninguna plántula con esas características, a diferencia de los tratamientos control, 90:10 y 75:25 que presentaban, respectivamente, el 65, 68 y 52 % de plantas germinadas. Las plántulas desarrolladas se clasificaron, en atención a su altura, en tres niveles cuyos límites en centímetros comprendían,  $5 < h_1 < 3,5$ ;  $1,5 < h_2 < 2,5$  y  $h_3 < 1,5$ . En la tabla 60 se expone el número medio de plántulas en función de su altura.

El número total de plántulas encontrado es similar en los tres tratamientos donde

## VI. Validación agronómica de los productos

la germinación se consumió con éxito. Sin embargo, existen diferencias con relación a su altura. A medida que se aumentaba la proporción del Aquamato férrico en la mezcla, el número de plántulas con mayor altura descendía, a excepción de las plantas cultivadas en la proporción 90:10. Estas últimas presentan un incremento no significativo respecto del control cuando la altura comprendía valores entre 1,5 y 2,5 cm.

**Tabla 60** Influencia de los tratamientos sobre la altura de las plántulas de pimiento a los 15 días después de la siembra

Tratamiento	Plantas	2,5<h<3,5	1,5<h<2,5	h<1,5
Control	97	28 a	28 a	41 a
90 : 10	102	24 a	38 a	40 a
75 : 25	78	0,25 b	35 a	43 a
50 : 50	0	0 b	0 b	0 b

A los 15, 23 y 27 días de la siembra, se contabilizó dos veces más el número de plántulas con objeto de comprobar el transcurso de la germinación. El análisis de la varianza a los resultados obtenidos en los seis tratamientos y tres muestreos, no revela la existencia de una interacción tratamiento x muestreo. En la tabla 61 se presenta el número de plántulas promedio para cada tratamiento y en los tres muestreos realizados. Puede verse que un porcentaje de Aquamato férrico igual o superior al 25 % no favorece la germinación.

**Tabla 61** Influencia de los tratamientos sobre la germinación.

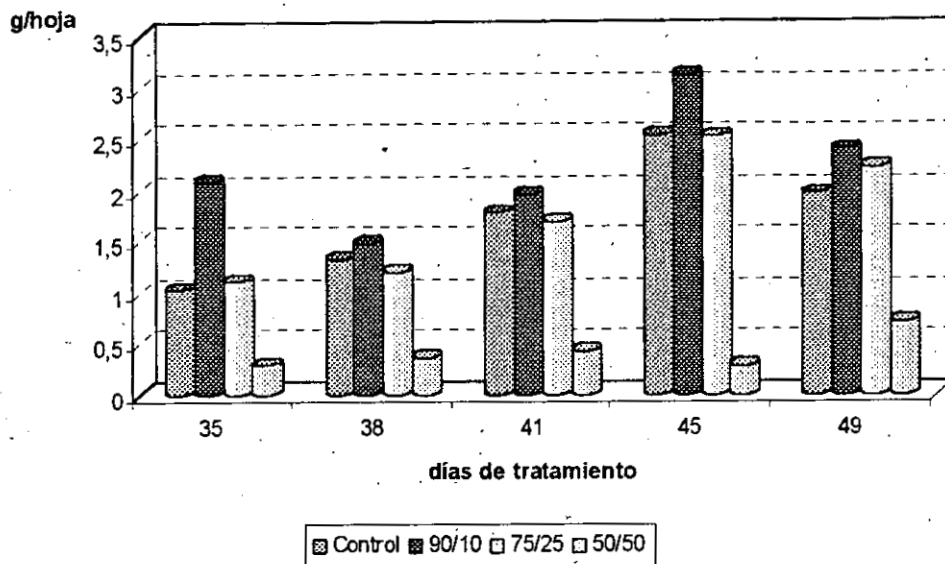
	Número	Porcentaje
Control	123 a	81,8 a
90:10	122 a	81,4 a
75:25	114 b	75,7 b
50:50	27 c	18,0 c

Para finalizar el estudio de los parámetros de crecimiento en plántulas de pimiento se valoró la evolución del peso fresco y peso seco a los largo del ensayo. Debido a la escasez del material vegetal, sólo se pudo efectuar el estudio estadístico de los tratamientos control 90:10 y 75:25 en el último muestreo.

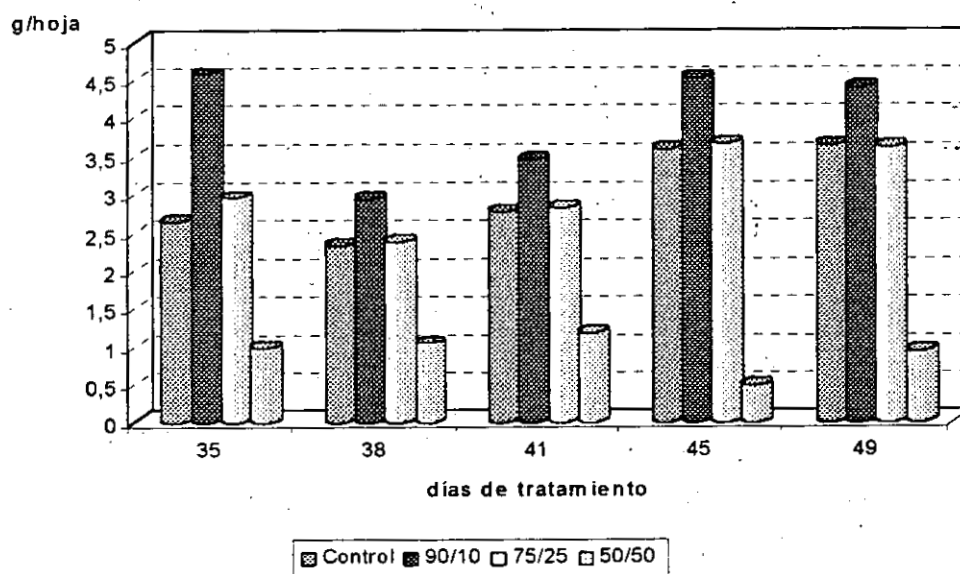
La evolución del peso fresco y del peso seco, tanto en parte aérea como en radicular, aparece en las figuras 64 a 67, al tiempo que en la tabla 62 se recogen las medias

## VI Validación agronómica de los productos

**Figura 64** Peso fresco de raíz para plántulas de pimiento en cada tratamiento y muestreo, cultivadas en invernadero comercial (Almería).



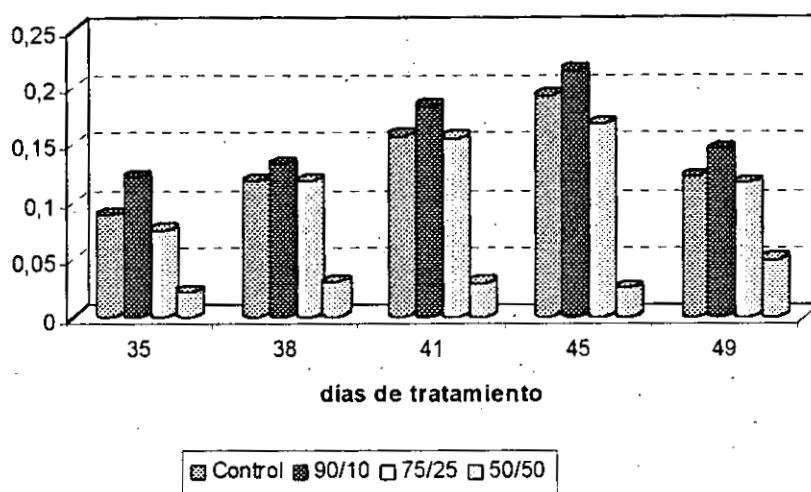
**Figura 65** Peso fresco de la parte aérea en plántulas de pimiento en cada tratamiento y muestreo, cultivadas en invernadero comercial (Almería)



## VI Validación agronómica de los productos

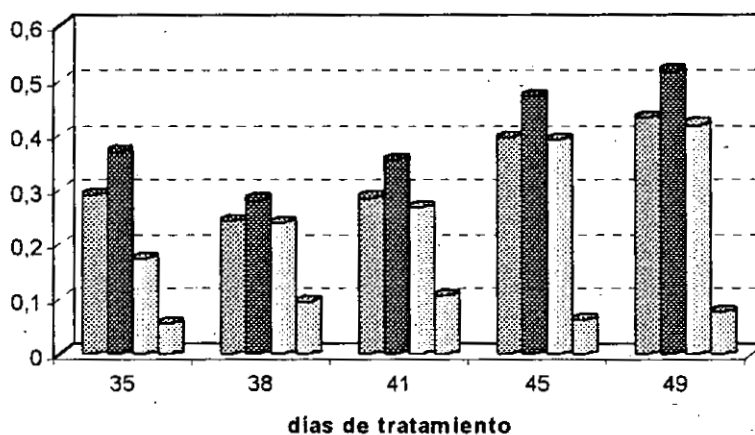
**Figura 66** Peso seco de raíz para plántulas de pimiento en cada tratamiento y muestreo, cultivadas en invernadero comercial (Almería).

g/hoja



**Figura 67** Peso seco de la parte aérea en plántulas de pimiento para cada tratamiento y muestreo, cultivadas en invernadero comercial (Almería).

g/hoja



**VI. Validación agronómica de los productos**

del último muestreo y la aplicación del test de Duncan a dichos datos. A lo largo de todo el ensayo se obtienen los mejores resultados, tanto en peso seco como en peso fresco, para la mezcla 90:10. El efecto de esta proporción en la parte radicular y en la parte aérea es progresivo, y se prolonga hasta el penúltimo muestreo. Sin embargo, los datos encontrados en el primero, indican que existe un efecto inicial del Aquamato férrico cuando éste se añade en pequeñas cantidades. A medida que transcurre el ensayo, se incrementa el efecto positivo de la mezcla 75:25, aproximándose los valores encontrados para el tratamiento control.

**Tabla 62** Peso fresco y seco de las plantas de pimiento al final del ensayo de invernadero comercial. Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ )

	Peso fresco (g.planta <sup>-1</sup> )			Peso seco (g.planta <sup>-1</sup> )		
	Parte aérea	Raíz	Planta total	Parte aérea	Raíz	Planta total
Control	3,63 b	1,96 a	5,59 b	0,43 b	0,20 ab	0,62 b
90:10	4,38 a	2,39 a	6,77 a	0,52 a	0,23 a	0,75 a
75:25	3,60 b	2,23 a	5,83 a	0,42 b	0,19 b	0,61 b
50:50*	0,93	0,71	1,64	0,11	0,05	0,16

\* Datos no incluidos en el tratamiento estadístico al no haber repeticiones suficientes

Tal y como se esperaba, teniendo en cuenta el aspecto externo de las plantas, el tratamiento 90:10 mejora el peso fresco y seco de la planta, principalmente en parte aérea. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas entre los tratamientos control y 75:25 en parte aérea, incidiendo positivamente en el peso seco total de la planta. Las diferencias no fueron tan notables en raíz, lo cual resulta explicable como consecuencia de la importante variabilidad que arrojan los resultados obtenidos.

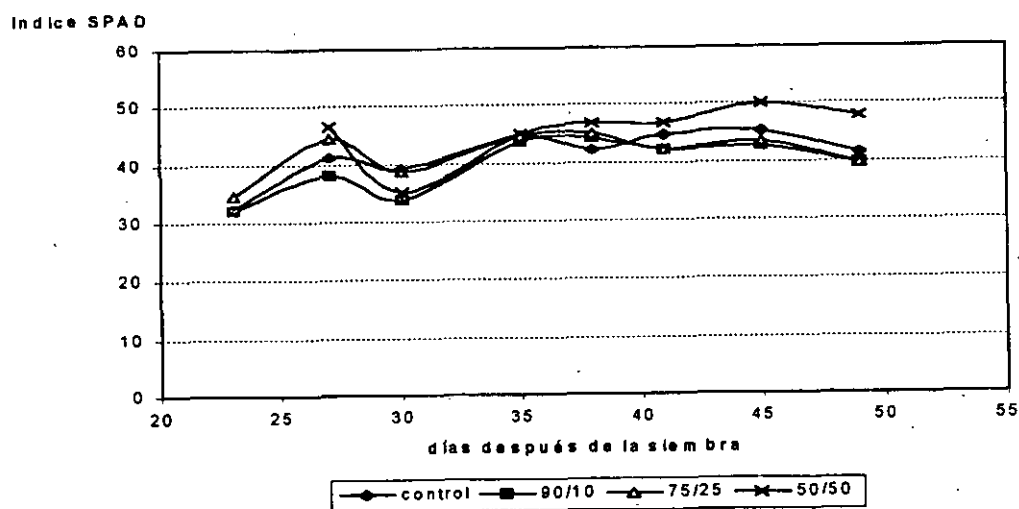
Por lo que se refiere al tratamiento 50:50, en éste no se produjo germinación hasta transcurridos 23 días desde la siembra. En ese momento se observaron plántulas ligeramente desarrolladas, que presentaban un tamaño inferior a 1,5 cm, no existiendo plantas de altura superior a 6 cm. Al final de la experiencia, las mayores producciones y tamaños de plántulas

## VI. Validación agronómica de los productos

### 2.3.1.2. Índice SPAD y pigmentos fotosintéticos

El índice SPAD no se pudo aplicar a la evaluación de los tratamientos hasta que transcurrieron 35 días desde la siembra, toda vez que el tamaño de las plántulas no era suficiente para hacer las mediciones en hoja. El comportamiento de este parámetro en los muestreos (figura 68) refleja la existencia de una interacción tratamiento x muestreo altamente significativa, por lo que se realizó el estudio estadístico con independencia de esta circunstancia. En este caso, las plantas tratadas con la proporción 50:50 mostraron los valores más elevados, existiendo diferencias significativas entre tratamientos en la mayoría de los muestreos, principalmente al final del ensayo. El Tratamiento 75:25 mostró un buen desarrollo al principio de la experiencia, incrementándose el valor del índice SPAD hasta el día 42, a partir del cual este índice comienza a descender hasta alcanzar valores similares a los obtenidos en el tratamiento 90:10, especialmente al final del ensayo. El tratamiento 90:10 es el que, por otra parte, revela los resultados más bajos en todo el experimento. se encontraron en los tratamientos 90:10 y control.

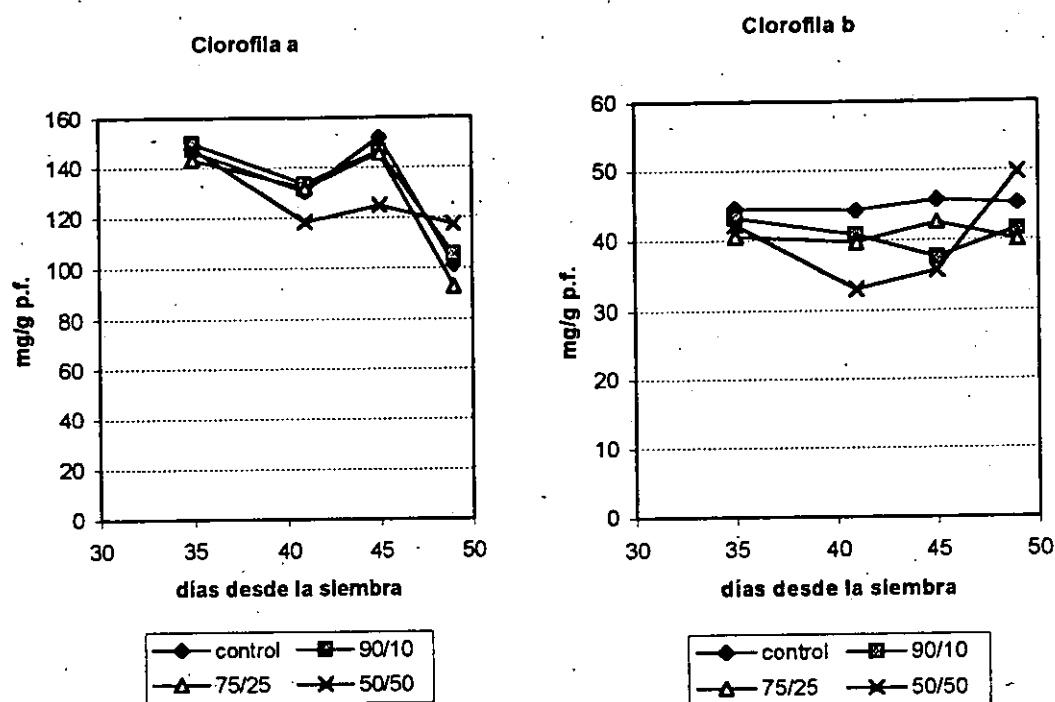
**Figura 68** Evolución del índice Spad en plantas de pimiento



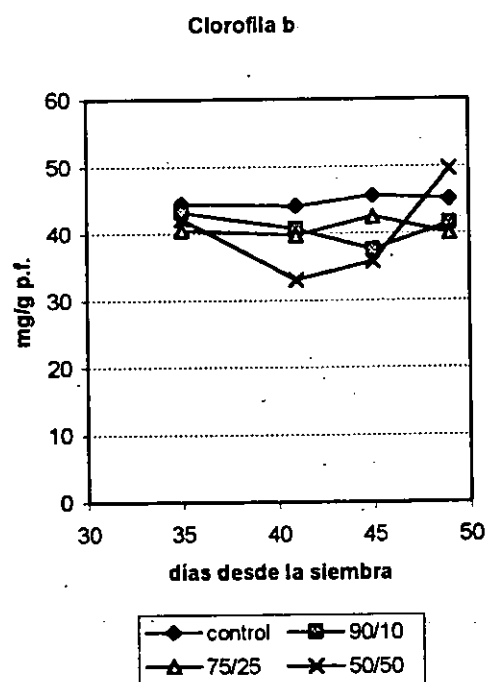
La interacción tratamiento x muestreo es también altamente significativa cuando se efectúa el estudio del análisis de la varianza sobre los datos de clorofilas a y b medidos en planta de pimiento. Por el contrario, esta interacción no se observa en la concentración de

## VI Validación agronómica de los productos

**Figura 69** Contenido en clorofilas a y b ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  Pf) en hojas de pimiento cultivado en invernadero comercial (Almería).



**Figura 70** Contenido en carotenos ( $\text{mg/g} \cdot \text{l Pf}$ ) en hoja de pimiento cultivadas en invernadero comercial



## VI. Validación agronómica de los productos

carotenos, respecto de la cual el tratamiento 90:10 presenta los valores más elevados y en principio favorables. Bien es cierto que ello obedece, principalmente, a la diferencia que en cuanto a tal parámetro se encontró en el último muestreo.

Ha sido generalmente aceptado que la clorofila y otros pigmentos accesorios son necesarios para la captura de la energía radiante en el proceso de fotosíntesis. Igualmente, se consideran que estos factores no son limitantes a menos que las plantas estén bajo graves alteraciones nutricionales, pero el proceso está también influido de forma importante por otros factores de tipo ambiental y genotípico. Salvando estas observaciones, existen autores que han correlacionado el contenido clorofílico y el nivel de nutrientes inorgánicos. Keller y Koch (1962) mostraron la existencia de una buena correlación entre la clorofila y el contenido de Fe foliar en tres clones de *Populus euroamericana*, cuando el nivel de Fe estaba comprendido entre 20-800 mg·L<sup>-1</sup>. López Cantarero y Romero (1993) consideran las clorofilas como buenos indicadores de N foliar, y Sánchez (1993) relacionó el contenido de clorofilas de plantas de pimiento *Capsicum annuum* con el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y el N orgánico.

Con relación a las clorofilas, su evolución aparece en la figura 69. En la misma aparece mostrarse una tendencia favorable en el tratamiento 90:10, aunque no es tan marcada como en el caso de los carotenos. El contenido de clorofila a descende en todos los tratamientos a partir del día 45, mientras que el contenido en clorofila b se mantiene uniforme, a excepción del tratamiento de proporción 50:50 en el que se incrementa.

### *2.3.1.3. Análisis mineral*

#### *A) Macronutrientes*

El resultado del análisis de macronutrientes se recoge en las figuras 71 a 76 que exponen la evolución de los macronutrientes en raíces, tallos y hojas de pimiento. En el último muestreo, los datos de los tratamientos control, 90:10 y 75:25 son media de cuatro repeticiones y se incluyen en la tabla 63. Como ya se ha indicado anteriormente, dado el escaso material vegetal para el tratamiento 50:50 sólo se pudo dar un valor por elemento. Esta circunstancia revela, en sí misma, una primera conclusión a la hora de recomendar la



## VI. Validación agronómica de los productos

utilización de esta mezcla en el cultivo de plantas de pimiento y en las condiciones del ensayo.

De acuerdo con los niveles de referencia sugeridos por Jones (1991) para hojas de pimiento, los análisis foliares resultantes de nuestro ensayo presentan al final del ensayo valores deficientes de Ca y N en todos los tratamientos. Estos valores de referencia corresponden a plantas adultas, por lo que no pueden ser aplicados sino de forma meramente orientativa, y sin que por sí solos determinen la valoración de los nutrientes. Por otra parte, el resto de los macronutrientes se encontraban dentro de los niveles considerados como suficientes.

Todos los tratamientos incrementaron el N foliar respecto al control, en proporción directa a la cantidad de Aquamato férrico en la mezcla, como se recoge en la figura 71. En el último muestreo estas diferencias no fueron, sin embargo, estadísticamente significativas, salvo respecto de la raíz. En esta órgano, este nutriente también se incrementa en los tratamientos 90:10 y 75:25, aunque en el caso del primero presenta valores de N menores, siendo únicamente significativo respecto del tratamiento 75:25, pero no respecto del control.

De otro lado, por lo que hace referencia al P, se encontraron diferencias importantes. Siguiendo los datos contenidos en la figura 72, cabe señalar que el tratamiento control incrementó el valor en raíces, hojas y tallos a lo largo de todo el ensayo. Las diferencias son significativamente importantes en todos los casos para el tratamiento 75:25, mientras que en el tratamiento 90:10 esta diferencia en hojas no se observa hasta el final del ensayo (tabla 63).

En relación con otros elementos, debe afirmarse que no se observa efecto de los tratamientos sobre la concentración de K, tal como se deduce de la figura 73 y de la tabla 63, que recogen la evolución de este macronutriente y los valores alcanzados en el último muestreo, respectivamente.

Considerando los bajos niveles de Ca encontrados en hoja en todos los tratamientos, en la figura 74 se observa que el incremento de la proporción de Aquamato férrico en la

## VI. Validación agronómica de los productos

mezcla aumenta los niveles de este elemento en parte aérea, al tiempo que produce disminución en la zona radicular. Este dato permite indicar que mejora la movilización de Ca desde la raíz a la parte aérea. El tratamiento control es el que más incrementa el Ca en la raíz, si bien el contenido foliar es el menor, por lo que la movilización es igualmente menor (tabla 63).

**Tabla 63** Análisis de macronutrientes de plantas de pimiento al final del ensayo Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas según el tes de Duncan( $\alpha=0,05$ )

	Raíz	Tallo	Hoja
<b>N (g·100g<sup>-1</sup> m.s.)</b>			
Control	2,02 ab	1,23 n.s.	2,31 n.s.
90:10	1,97 b	1,31	2,46
75:25	2,18 a	1,37	2,60
50:50*	3,93	2,52	3,79
<b>P (g·100g<sup>-1</sup> m.s.)</b>			
Control	1,193 a	0,546 a	0,715 a
90:10	0,656 b	0,439 b	0,551 ab
75:25	0,496 c	0,386 b	0,399 b
50:50*	0,325	0,171	0,229
<b>K (g·100g<sup>-1</sup> m.s.)</b>			
Control	2,24n.s	4,21 n.s	2,78 n.s
90:10	2,36	4,34	2,73
75:25	2,23	4,38	2,50
50:50*	3,91	4,18	3,61
<b>Ca (g·100g<sup>-1</sup> m.s.)</b>			
Control	0,057 n.s	0,046 b	0,088 ab
90:10	0,056	0,047 b	0,079 b
75:25	0,041	0,056 a	0,106 a
50:50*	0,048	0,108	0,169
<b>Mg (g·100g<sup>-1</sup> m.s.)</b>			
Control	0,670 n.s.	0,480 a	0,584 n.s.
90:10	0,823	0,392 b	0,600
75:25	0,808	0,412 b	0,523
50:50*	0,984	0,767	0,781

\* Datos no incluidos en el tratamiento estadístico al no haber repeticiones suficientes.

## VI. Validación agronómica de los productos

Figura 71 Concentración de N en plantas de pimiento cultivadas en invernadero de investigación

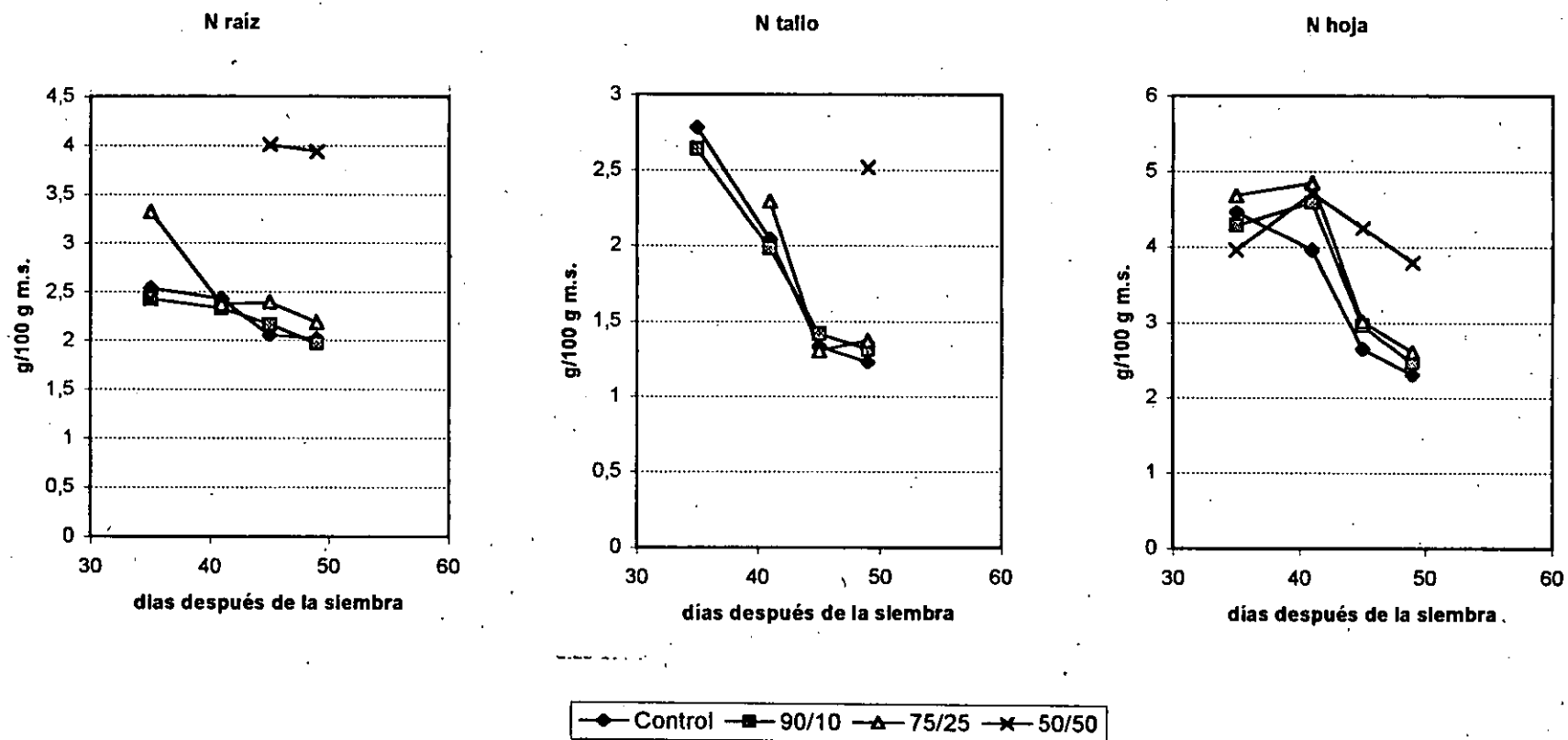
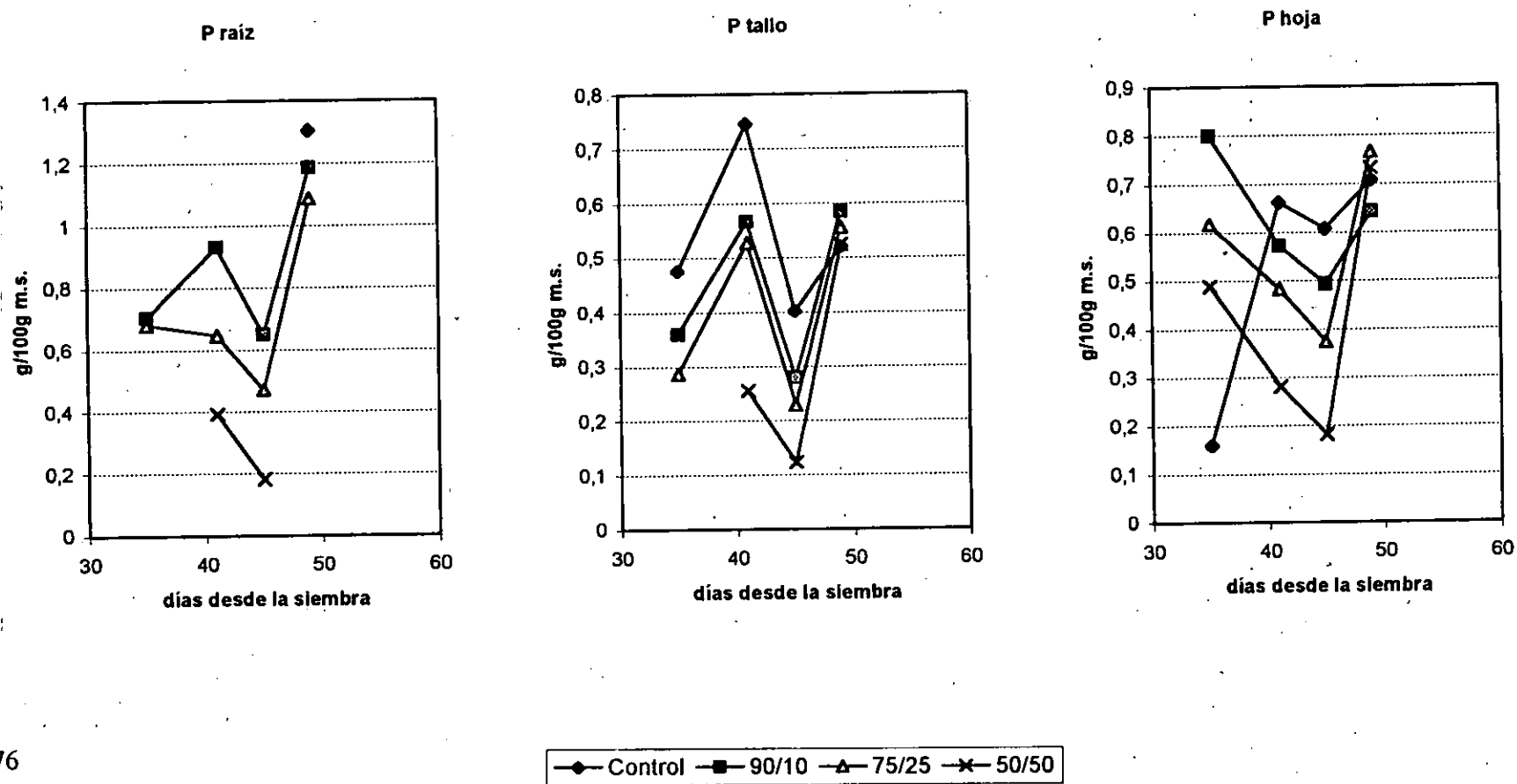


Figura 72 Concentración de P en plantas de pimiento cultivadas en invernadero comercial (Almería).



**Figura 73** Concentración de K en plantas de pimiento cultivadas en invernaderos comerciales (Almería).

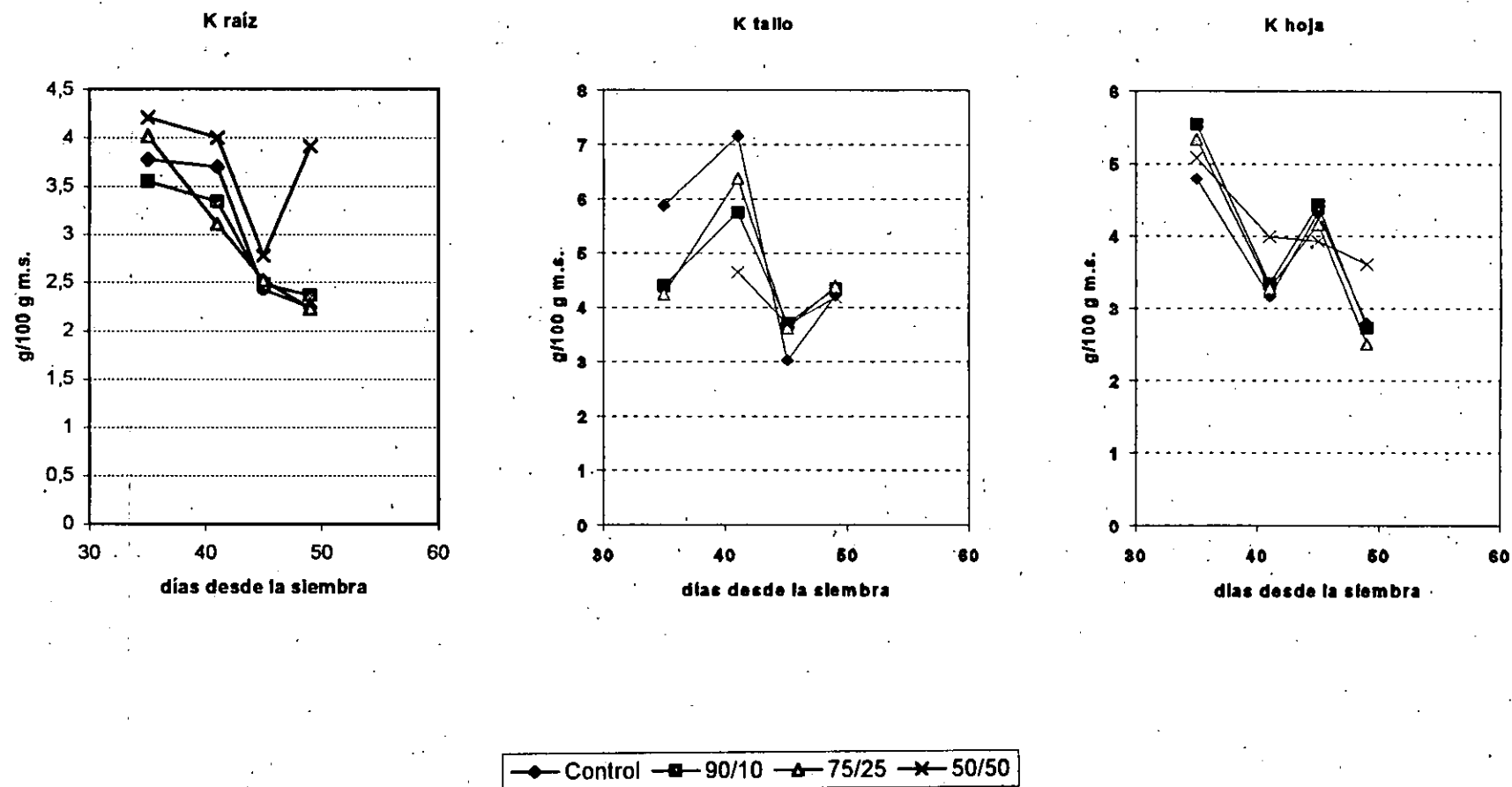
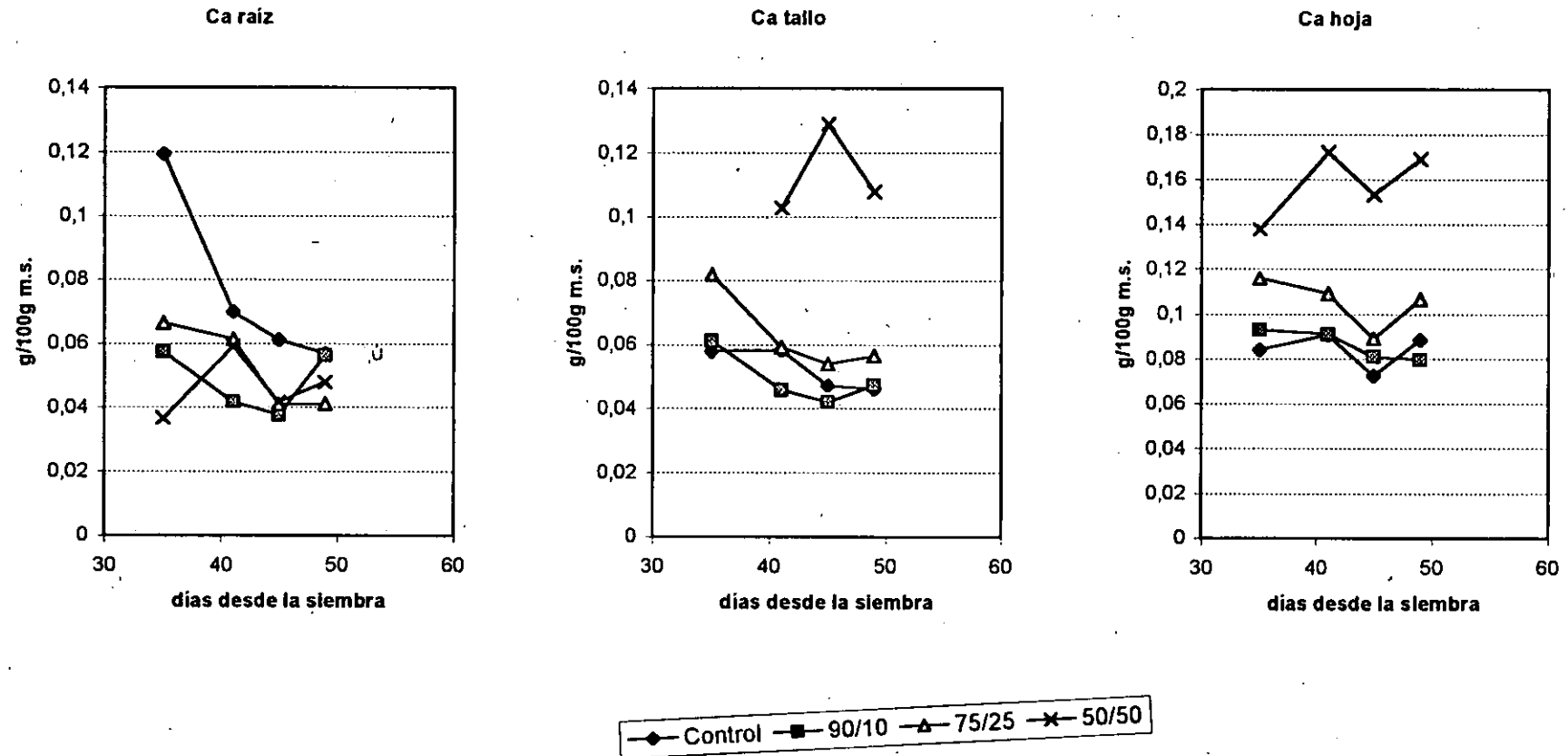
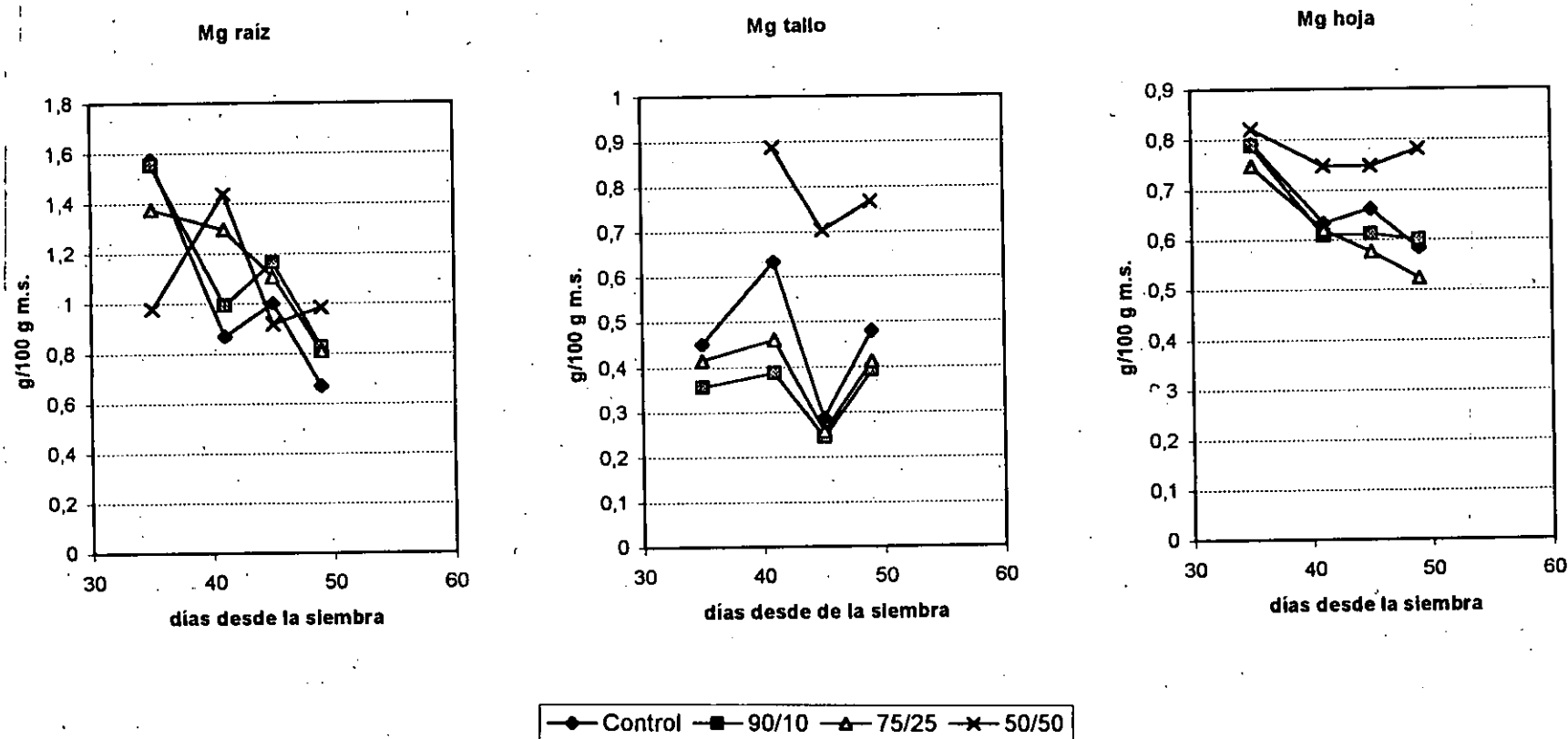


Figura 74 Concentración de Ca en plantas de pimiento cultivadas en invernadero comercial (Almería).



## VI. Validación agronómica de los productos

Figura 75 Concentración de Mg en plantas de pimiento cultivadas en invernadero comercial (Almería).



## VI. Validación agronómica de los productos

El sustrato control mezclado a partes iguales con el Aquamato férrico es el tratamiento que más incrementa el contenido de Mg en parte aérea, así se recoge en la tabla 63. Por otro lado, el aporte en raíz no presenta una tendencia uniforme. En la figura 75 que inicialmente el contenido de Aquamato férrico en mezcla ejerce un efecto inversamente proporcional sobre la concentración del macronutriente, pero al final del ensayo la tendencia se invierte. Comparando los tres tratamientos de los que se pudo realizar estudio estadístico -control, 90:10 y 75:25-, existen diferencias significativas en la concentración de este macronutriente en tallo al final del experimento entre el tratamiento control y los otros dos tratamientos ensayados, en la forma que se indica en la tabla 63.

### *B) Micronutrientes*

La incidencia de los tratamientos sobre el contenido de Fe en plantas de pimiento muestra dos efectos. En general, el incremento de este micronutriente en la planta es proporcional a la cantidad de Aquamato férrico en la mezcla control, pero la influencia de la dosis es diferente en función del momento de su aplicación. Como se muestra en la figura 76. Inicialmente son los tratamientos 90:10 y 75:25 los que manifiestan un mejor rendimiento pero, a medida que transcurre el ensayo, el tratamiento 50:50 comienza a ser el más beneficioso. El resultado es que la efectividad de las proporciones 90:10 y 75:25 es mayor al inicio del ensayo - primer y segundo muestreo- mientras que la dosis 50:50 incrementa la proporción de Fe de forma más acusada, principalmente, en el segundo. Al final del ensayo, el efecto de los tratamientos es menor y, en concreto, los tratamientos 90:10 y 75:25 no producen aporte de Fe desde el sustrato a la planta.

Este micronutriente se trasloca desde la raíz a la planta en el primer y segundo muestreos respecto de los tratamientos 90:10 y 75:25, reteniéndose, por el contrario, en el tallo en los dos posteriores -véanse la figura 76 . Por su parte, en el tratamiento 50:50 todo el Fe se trasloca a la hoja, de forma especial en el segundo muestreo. De dónde cabe deducir que el Fe es asimilado por la planta.

Con relación a la significación estadística en el último muestreo, cuyos resultados se exhiben en la tabla 62, existen diferencias significativas en los contenidos de Fe en raíz



## VI. Validación agronómica de los productos

entre la proporción 90:10 y el tratamiento control. Además, son también significativas las diferencia de contenido en el tallo respecto de aquél tratamiento y el de proporción 75:25. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos respecto los contenidos de este elemento en hoja.

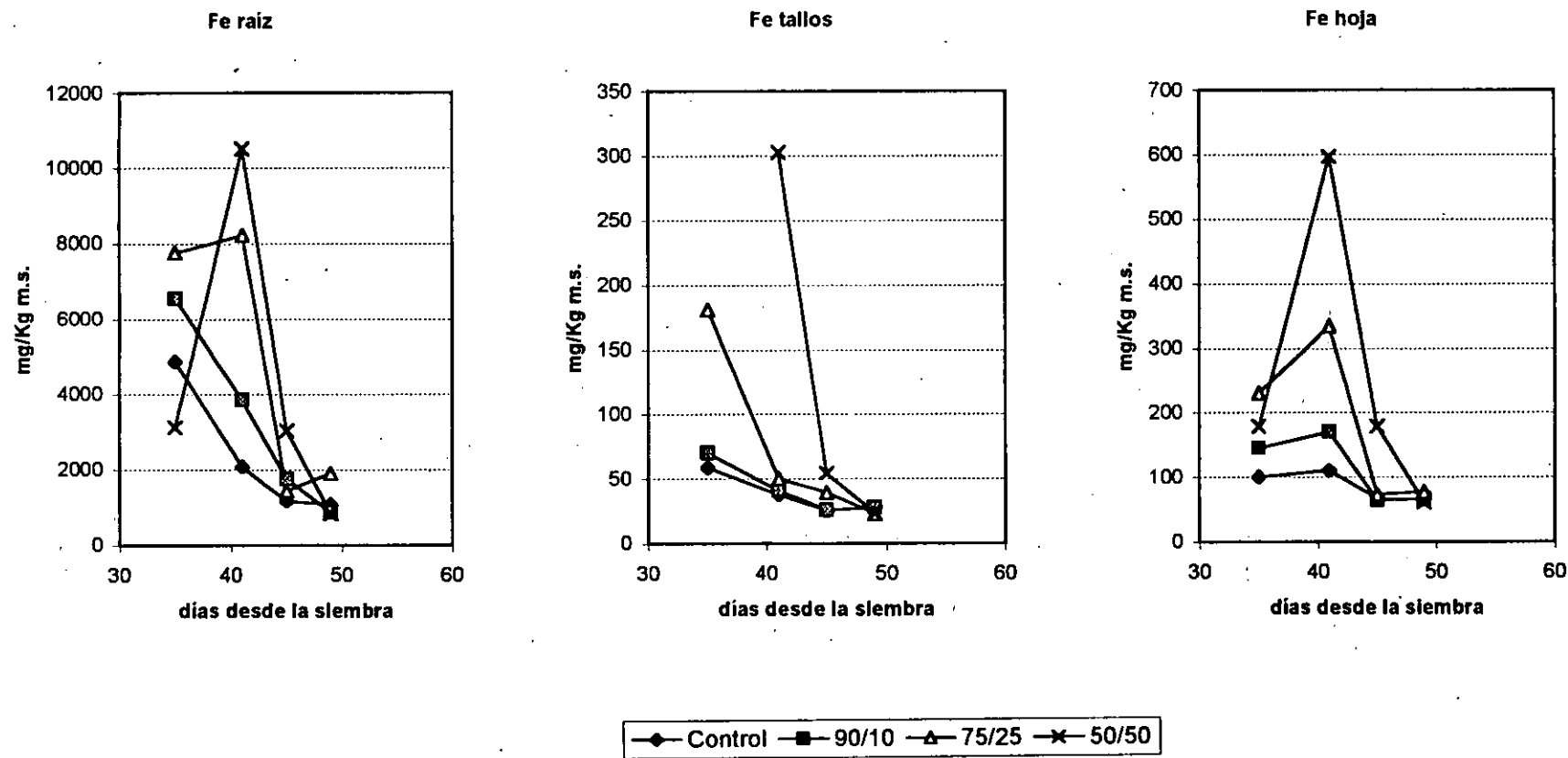
**Tabla 64** Análisis de micronutrientes de plantas de pimiento al final del ensayo Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ )

	Raíz	Tallo	Hoja
<b>Fe (<math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math> m.s.)</b>			
Control	1167 b	25,37 b	67,30 n.s.
90:10	2311 a	25,92 b	63,97
75:25	1439 ab.	39,27 a	73,20
50:50*	3034	54,60	178,9
<b>Mn (<math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math> m.s.)</b>			
Control	18,1 c	10,1 b	32,3 b
90:10	37,3 b	7,08 b	31,8 b
75:25	65,8 a	21,6 a	73,0 a
50:50*	219	33	143
<b>Cu (<math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math> m.s.)</b>			
Control	22,95 n.s.	9,05 n.s.	20,33 b
90:10	23,65	8,15	24,03 a
75:25	22,85	8,45	21,70 ab
50:50*	26,18	10,98	8,58
<b>Zn (<math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math> m.s.)</b>			
Control	50,50 c	12,12 c	72,40 b
90:10	182,5 b	33,87 b	141,7 a
75:25	260,7 a	47,97 a	146,3 a
50:50*	359	70,5	145

\* Datos no incluidos en el tratamiento estadístico al no haber repeticiones suficientes

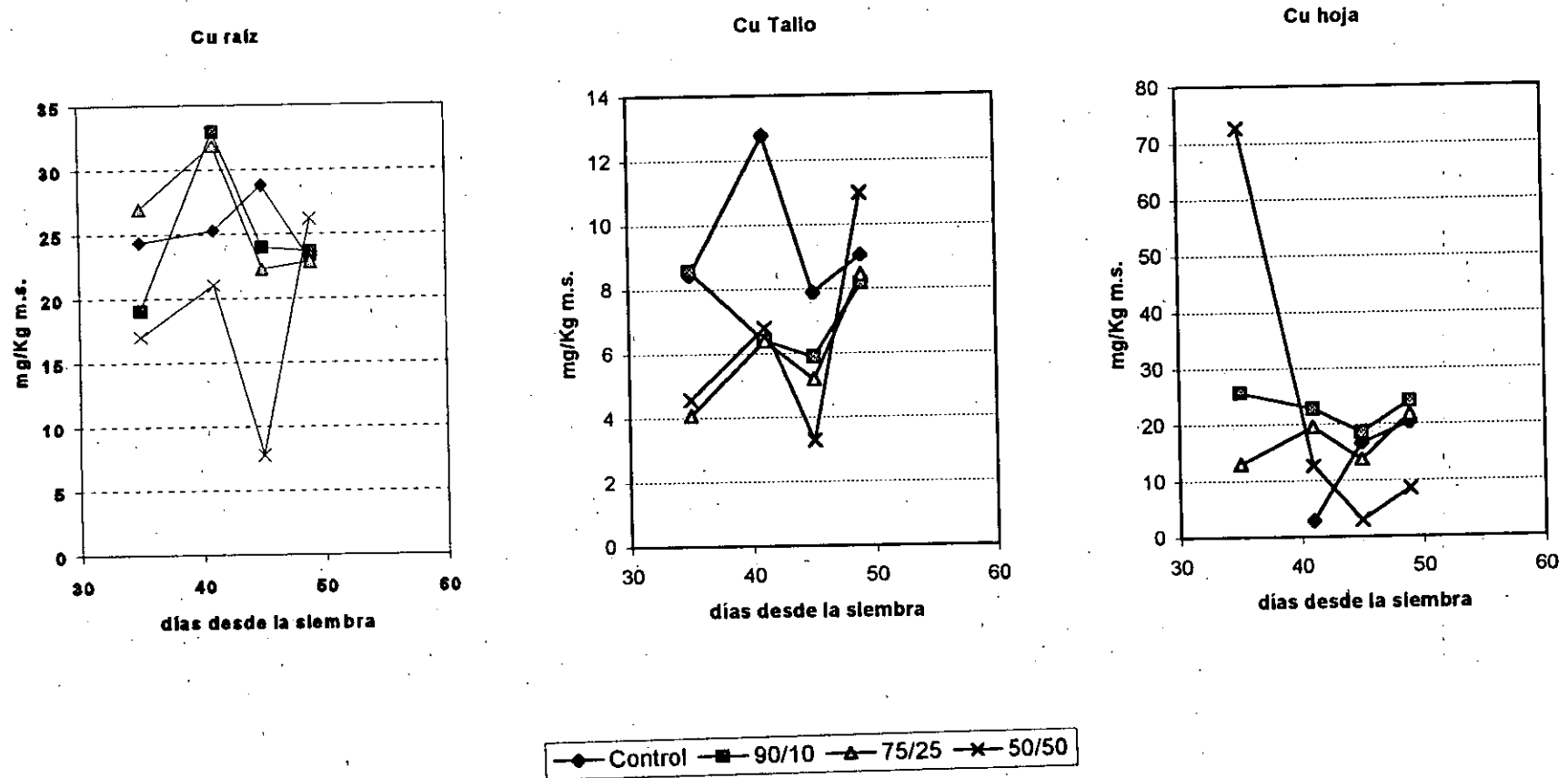
Aludiendo a un nuevo elemento, la figura 77 recoge el incremento neto en el contenido de Cu. Ha de ponerse de manifiesto que de la experiencia se deduce que el Cu se acumula en la hoja, a partir del segundo muestreo. En la tabla 64 puede observarse que en el último muestreo se obtienen diferencias significativas entre el tratamiento 75:25 y el control.

**Figura 76** Concentración de Fe en plantas de pimiento cultivadas en invernadero comercial (Almería)



## VI Validación agronómica de los productos

Figura 77 Concentración de Cu en plantas de pimiento cultivadas en invernadero comercial (Almería).



## VI Validación agronómica de los productos

Figura 78 Concentración de Mn en plantas de pimiento cultivadas en invernadero comercial (Almería).

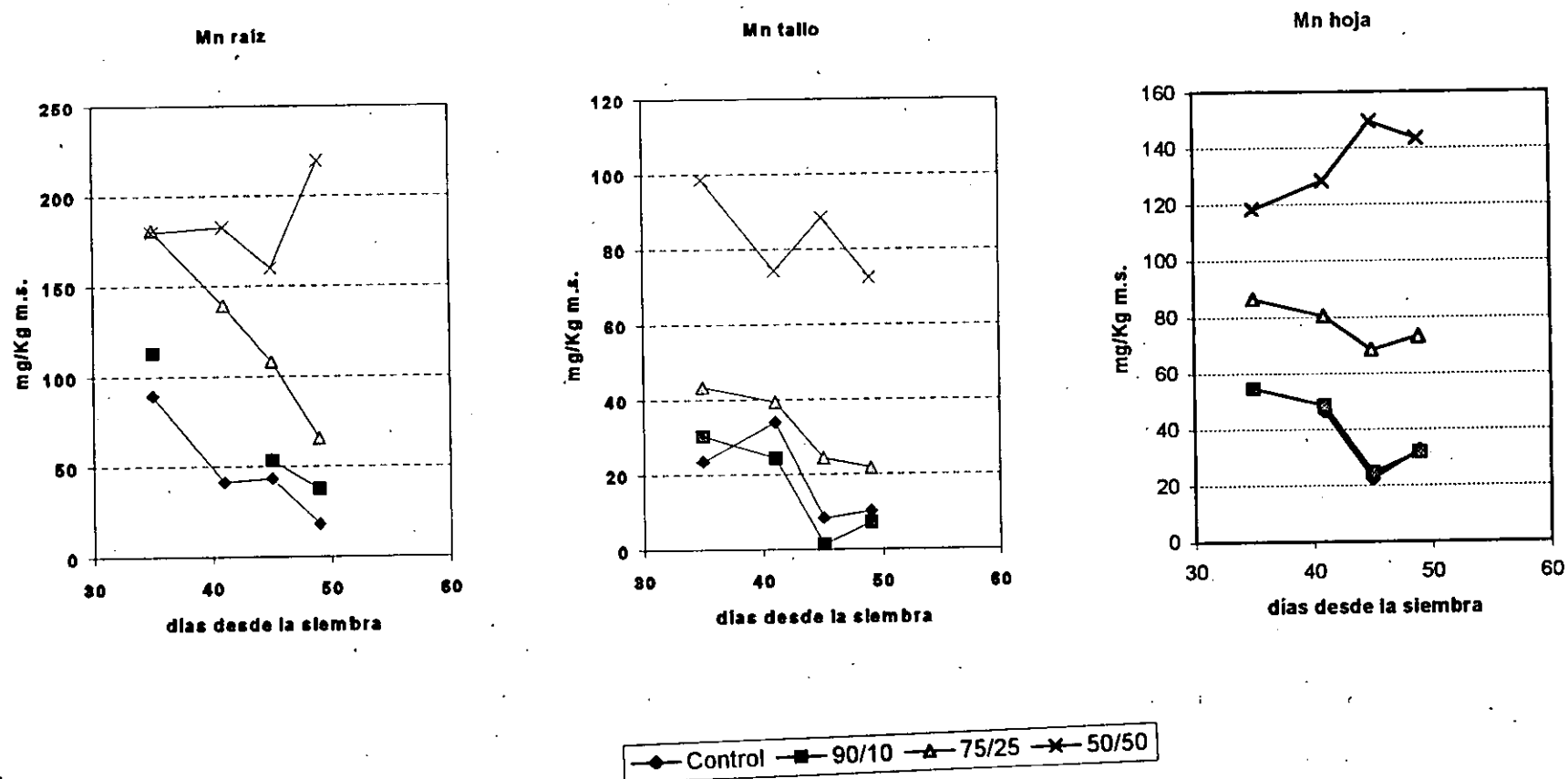
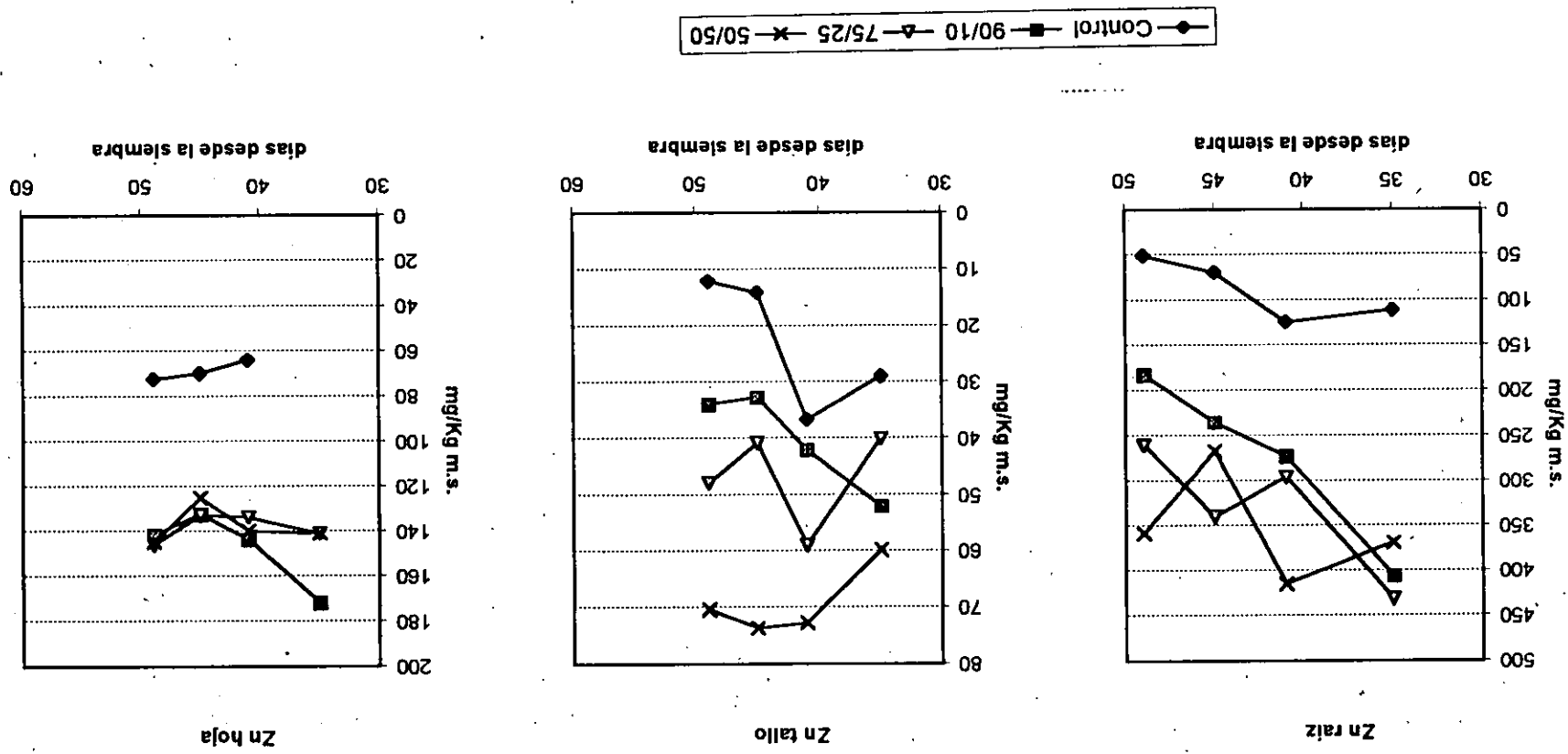


Figura 79 Concentración de Zn en plantas de pimiento cultivadas en invernadero comercial (Almería).



VI Validación agronómica de los productos

## VI. Validación agronómica de los productos

Asimismo, las concentraciones de Mn y Zn se vieron claramente influidas por el efecto de los tratamientos. La concentración de Mn, tanto en raíz como en tallo y hoja (figura 77), evolucionó en relación directa con el aumento en el contenido de Aquamato férrico en el sustrato y disminuyó con el transcurso del ensayo. Dicho efecto es particularmente importante respecto de los tratamientos 75:25 y 50:50, pero es poco apreciable en el tratamiento 90:10. De forma más concreta, su incidencia es especialmente notable en planta completa y durante el primer muestreo. A partir del tercer muestreo, el tratamiento 90:10 es capaz de incrementar ligeramente los contenidos de Mn en raíces y hojas de planta de pimiento, muestras que al final del ensayo su concentración en raíz manifiesta diferencias significativas respecto al tratamiento control, como puede apreciarse en la tabl 64. Esto indica que, incluso, menores cantidades de Aquamato férrico en el sustrato control son capaces de movilizar el Mn.

Similar situación se pudo describir en cuanto al incremento de Zn en plantas de pimiento. Si bien los contenidos de este micronutriente evolucionaron de forma favorable, de acuerdo con los resultados mostrados en la figura 78, no reflejaron una tendencia creciente en función de la cantidad de Aquamato férrico en relación con los incrementos en hoja, aunque sí se dan en esa proporción directa respecto del tallo y raíz.

### *2.3.1.4 Influencia sobre la nutrición férrica*

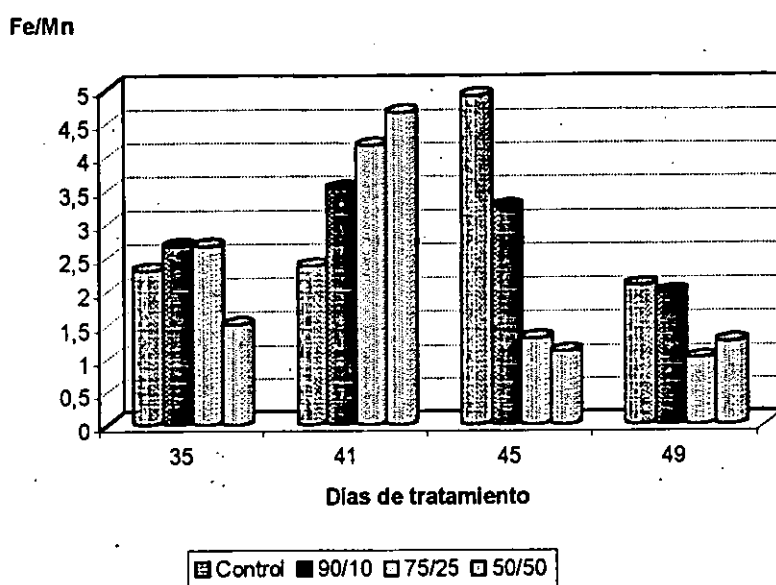
La influencia de los tratamientos sobre los índices de nutrición férrica presenta diferentes lecturas, en función de los elementos que participan en las relaciones, es decir, según éstos sean exclusivamente Fe y Mn o si, además, se consideran el P o el K.

La relación Fe/Mn para las plántulas de pimiento presenta un comportamiento variable y grandes oscilaciones que son descritas en la figura 80. Inicialmente, los tratamientos intermedios, 90:10 y 75:25, presentaban la relación Fe/Mn más elevada. En el segundo muestreo, este índice aumenta drásticamente en los tratamientos férricos y en proporción directa a la cantidad de Aquamato férrico en la mezcla, siendo el tratamiento 50:50 el que mayor valor presenta. No obstante, esta tendencia favorable no se manifiesta en los dos últimos muestreos. En ambos casos, el control presenta una relación Fe/Mn

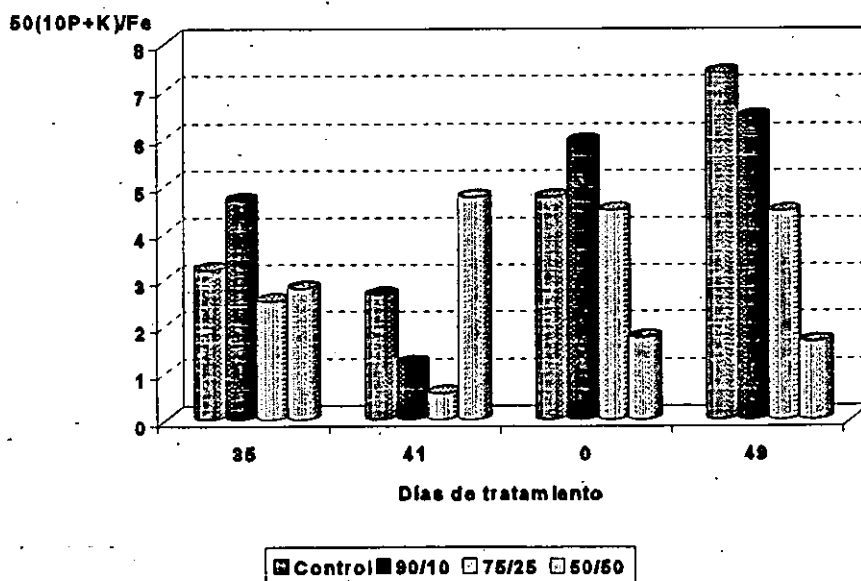
## VI. Validación agronómica de los productos

mayor y en el resto de los tratamientos ésta disminuye. De lo expuesto cabe inducir que este índice no parece muy apropiado para evaluar el estado férrico de las plántulas de pimiento en las condiciones de éste ensayo, probablemente por el efecto positivo que tuvieron los tratamientos sobre la concentración de Mn.

**Figura 80** Relación Fe/Mn en hojas de pimiento cultivadas en Almería



**Figura 81** Relación  $50(10P+K)/Fe$  en hojas de pimiento cultivadas Almería



## VI. Validación agronómica de los productos

Un comportamiento un tanto más uniforme se refleja en la otra relación que ha sido estudiada,  $50(10P+K)/Fe$ , y que se exhibe en la figura 81. El tratamiento 50:50 se revela como el más eficaz, ya que presenta los menores valores en la relación  $50(10P+K)/Fe$ , con excepción de lo apreciado en el segundo muestreo. Al final del ensayo los tres tratamientos se mostraron eficaces, evidenciando así la capacidad de estos compuestos para mejorar la nutrición férrica.

### *2.3.1.5 Resumen de resultados*

De los resultados obtenidos en el estudio de la aplicación del Aquamato férrico como mezcla de sustrato a un semillero de pimiento se puede resumir que:

- Los ensayos de germinación y desarrollo de plántulas en los primeros estadios de crecimiento indican que si bien pequeñas cantidades de Aquamato férrico, mezcladas con los sustratos utilizados tradicionalmente en cultivos intensivos, pueden favorecer, tanto la germinación como el posterior desarrollo de las plántulas, las proporciones elevadas pueden retardar la evolución de estos parámetros o incluso anularla.

- Otro efecto encontrado, especialmente en la relación 90:10, es el incremento del crecimiento radicular, especialmente en el peso fresco, lo que produce plántulas con mayores portes.

- El índice SPAD se correlaciona con el crecimiento, ya que fueron las menores proporciones de Aquamato férrico en la mezcla las que más favorecieron el incremento de este índice. Otros indicadores fisiológicos, como los carotenos y clorofilas a y b, se correlacionan, igualmente, con el incremento de Aquamato férrico en la mezcla.

- Asimismo, se favorece la absorción radicular de N en proporción directa al incremento de Aquamato férrico. Por el contrario, los niveles de P se incrementan en las plántulas cultivadas en el sustrato control. Este factor podría ser uno de los limitantes en el desarrollo de las plántulas crecidas sobre el sustrato 50:50. Quizá por este motivo, un aumento de Aquamato férrico en la mezcla favorece la absorción de Ca y Mg en la parte



## VI. Validación agronómica de los productos

aérea, sin producir acumulación en la raíz.

• Las presencia de Aquamato férrico en la mezcla de sustrato supuso un incremento de todos los micronutrientes en hoja, tallo y raíz, a excepción del Cu, que sólo se mejoró en los niveles foliares. Este último micronutriente, disminuyó su contenido en hoja respecto del resto de los tratamientos cuando se aplicaron cantidades equivalentes de Aquamato férrico en la mezcla de sustrato.

• El efecto de la dosis sobre la absorción de Fe es variable en los distintos muestreos, incidiendo en mayor medida a corto plazo las dosis pequeñas, mientras que las elevadas lo hacen a más largo plazo.

• Es muy destacable el papel del Aquamato férrico en la nutrición del Zn, ya que este micronutriente que en altas cantidades puede causar problemas de toxicidad, evolucionó incrementándose con la presencia del fulvato en el sustrato, sin verse afectado por las dosis elevadas.

### 2.3.2. Experiencia con tomate

#### 2.3.2.1. Parámetros de crecimiento

Entre los parámetros valorados para describir la evolución de las plántulas de tomate

**Tabla 65** Número de plántulas de tomate y porcentaje de germinación a los 26 días de la siembra

	Plántulas	Germinaci
Control	176 ns	70,40 ns
95:5	179	71,60
90:10	179	71,70
85:15	169	67,70

se contabilizaron tanto el número de plantas como el porcentaje de germinación, factores que ya fueron utilizados en el ensayo de pimiento y que para el caso del tomate se muestran en la tabla 65. Además, se incorporaron como parámetros la longitud de la raíz y de la parte aérea, que aparecen recogidos en la tabla 66. A pesar de que el tratamiento 85:15 retardó la germinación respecto los otros tres tratamientos, a los 26 días de la siembra no se observaron

## VI Validación agronómica de los productos

diferencias en el número y porcentaje de germinación.

Con objeto de evaluar la longitud de las plantas se realizaron dos tomas de muestra, a los 39 y 49 días del inicio. Si bien en el primer muestreo las plántulas cultivadas sobre el sustrato control mostraron la mayor longitud de raíz y tallo, no se reflejaron diferencias significativas con relación al crecimiento radicular en aquellas que fueron tratadas con la mezcla 95:5. Estas diferencias aumentaron con la aplicación de los tratamientos, y a los 49 días desde el inicio de la siembra, las bajas dosis de Aquamato férrico propiciaron el crecimiento radicular y se acortaron las diferencias en el tallo.

El retraso producido en la germinación por el tratamiento 85:15 se manifiesta en el menor tamaño de las plántula, consecuencia de su menor edad.

**Tabla 66** Longitud de raíz y tallo en plántulas de tomate después de 39 y 49 días de la siembra. Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ )

	39 días		49 días	
	Raíz (cm)	Tallo(cm)	Raíz (cm)	Tallo (cm)
Control	5,62 a	12,4 a	6,83 bc	24,5 a
95:5	5,12 ab	10,5 b	7,33 a	23,6 ab
90:10	4,92 b	9,75 c	7,08 ab	22,3 b
85:15	3,88 c	6,02 d	6,60 c	14,4 c

### 2.3.2.2. Índice SPAD

La tabla 67 muestra los valores del índice SPAD para las plántulas de tomate en cada uno de los muestreos realizados. Cabe destacar, dada la poca repercusión de los tratamientos sobre el índice SPAD en los ensayos descritos previamente, que en esta ocasión todos los tratamientos incrementaron el índice SPAD respecto al control. Estas diferencias son además estadísticamente significativas y proporcionales a las dosis aplicadas, alcanzándose los valores mayores en las plántulas tratadas con un 15% de Aquamato férrico.

## VI. Validación agronómica de los productos

**Tabla 67** Valores del índice SPAD en plántulas de tomate en cada uno de los muestreos realizados. Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

	26 días	29 días	32 días	35 días	39 días	44 días	<M>
Control	37,4 c	34,5 c	32,3 c	34,6 b	34,8 c	34,0 c	34,6 c
95:5	40,5 b	37,5 b	34,9 b	36,7 b	37,1 b	37,0 b	37,3 b
90:10	41,2 b	37,5 b	34,3 b	36,2 b	38,3 b	38,4 b	37,6 b
85:15	44,2 a	39,8 a	36,6 a	39,6 a	40,4 a	40,8 a	40,3 a

<M> Medias entre muestreos.

### *2.3.2.3. Análisis mineral*

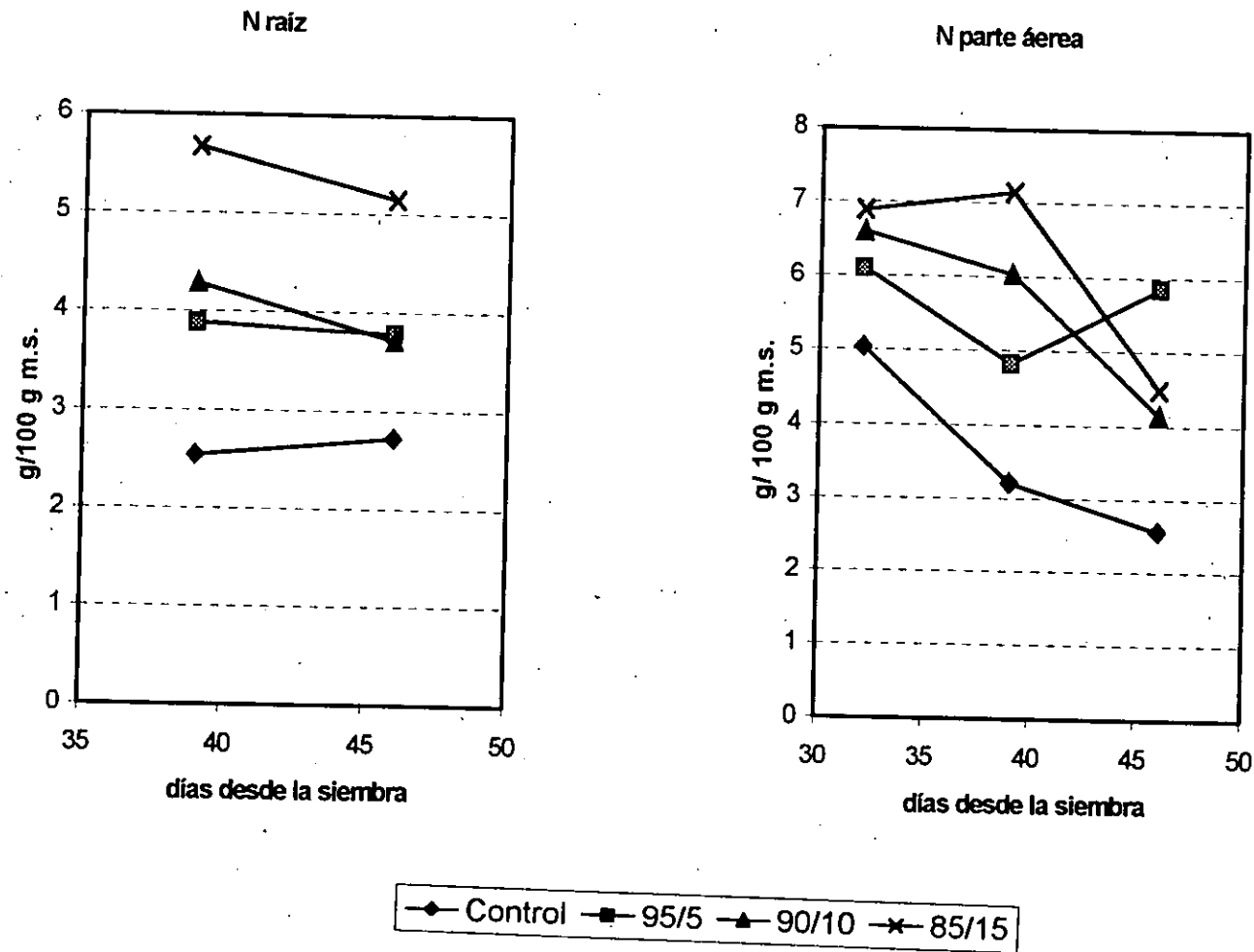
En esta experiencia no se produjeron suficientes plantas para realizar cuatro repeticiones por cada tratamiento, por lo que el análisis mineral sólo se pudo efectuar con base en una única muestra. Las figuras 82 a 88 presentan la evolución del elemento total a lo largo del ensayo para cada uno de los tratamientos. Dado que es difícil obtener conclusiones de las diferencias sin el tratamiento estadístico, solo se consideraran fiables las tendencias que sean congruentes con las dosis aplicadas y los ensayos anteriores.

#### *A) Macronutrientes*

Con relación al análisis de macronutrientes correspondiente a plántulas de tomate, los resultados obtenidos se encontraban dentro de los niveles normales, a tenor de los criterios de Jones y col. (1991). Debiendo subrayarse que la utilización de niveles de referencia es exclusivamente orientativa por estar realizada la experiencia con plántulas en lugar de con plantas adultas, por lo que no pueden ser aplicados sino con importantes matizaciones.

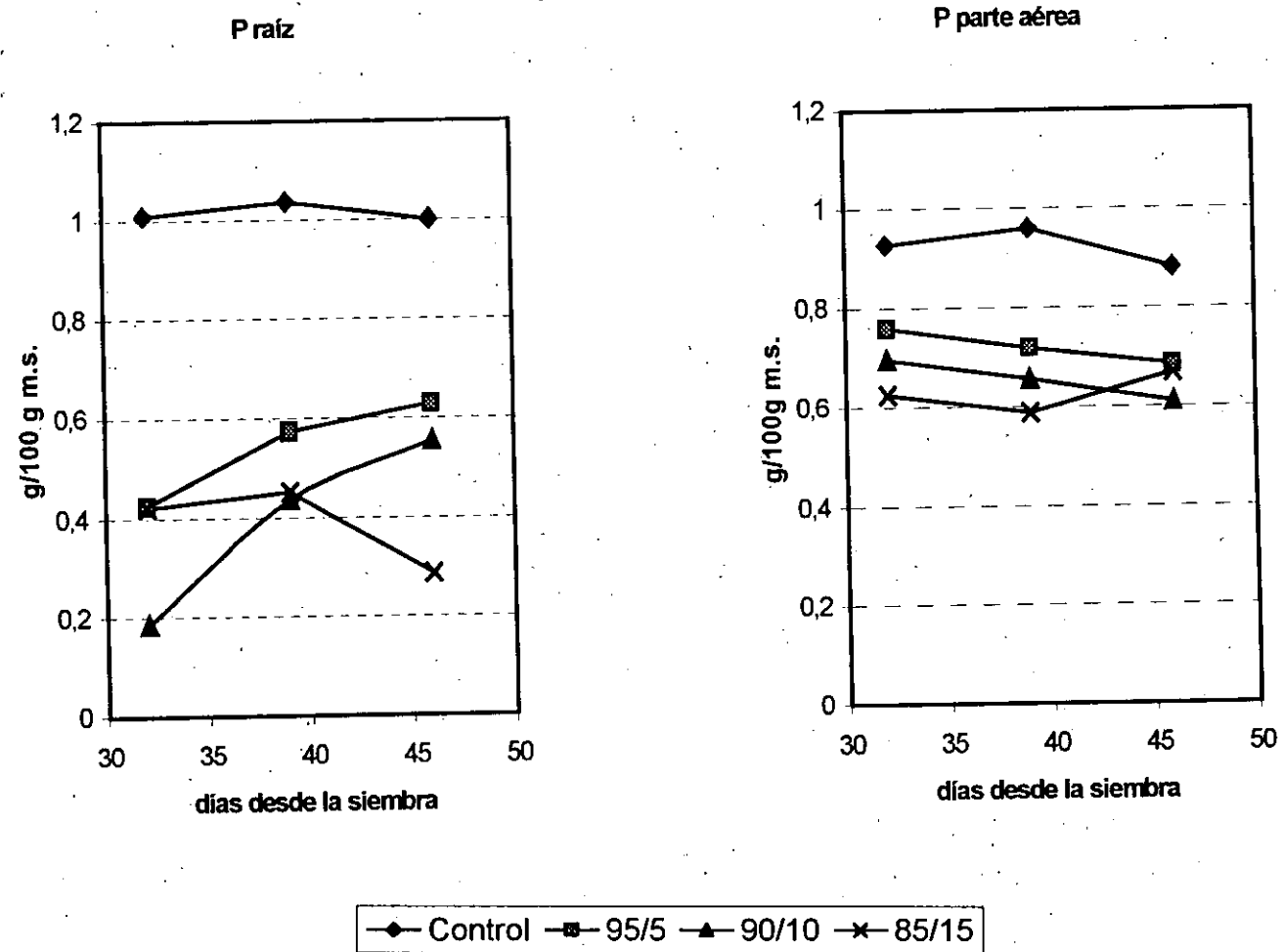
Todos los tratamientos fueron capaces de incrementar los niveles de N respecto del control a lo largo del ensayo, tal y como se advierte en la figura 82. La adición de Aquamato férrico en la mezcla beneficia la absorción de este macronutriente, tanto en raíz como en parte aérea.

Figura 82 Concentración de N en plantas de tomate cultivadas en invernadero comercial (Almería)



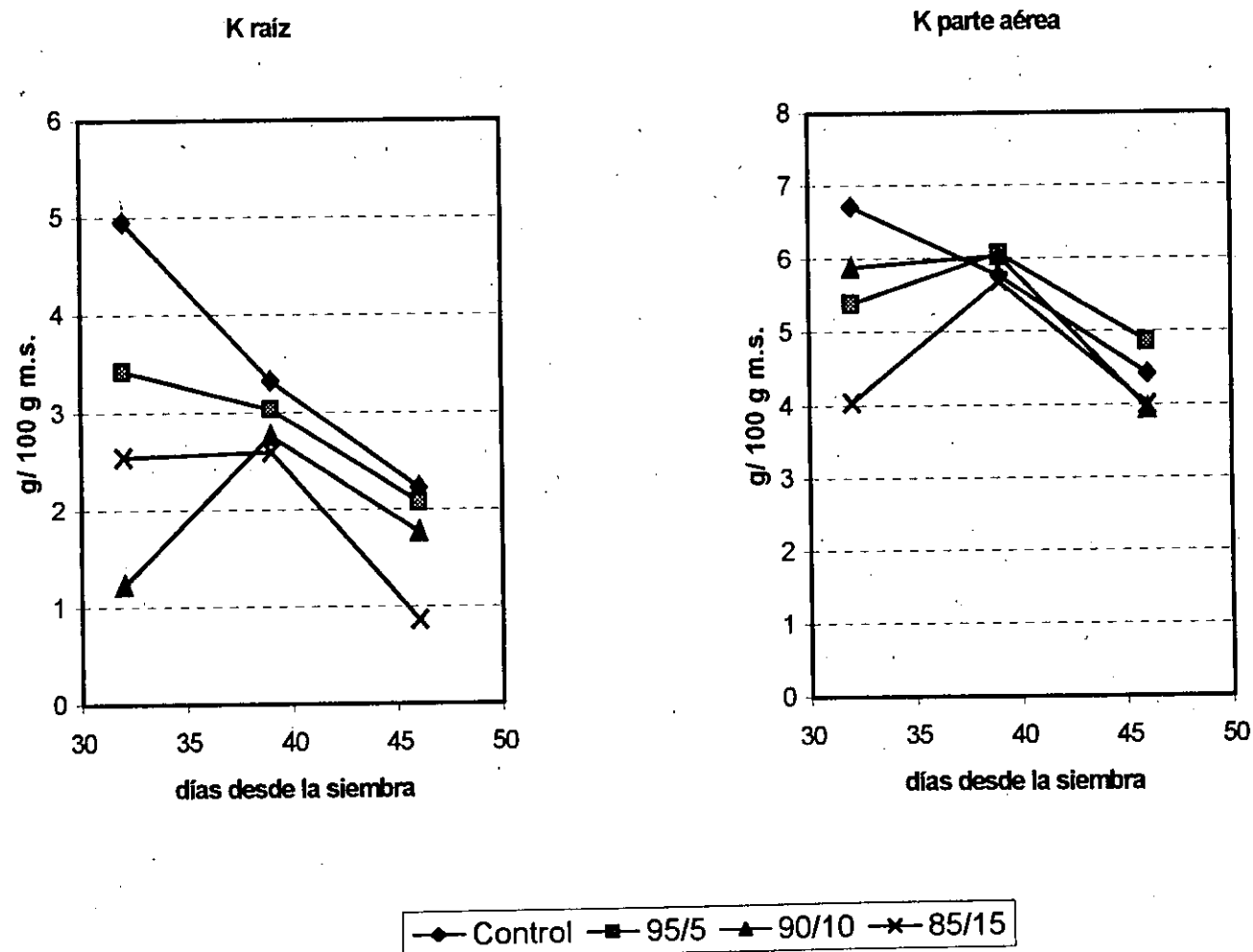
## VI. Validación agronómica de los productos

**Figura 83** Concentración de P en plantas de tomate cultivadas en invernadero comercial (Amería).



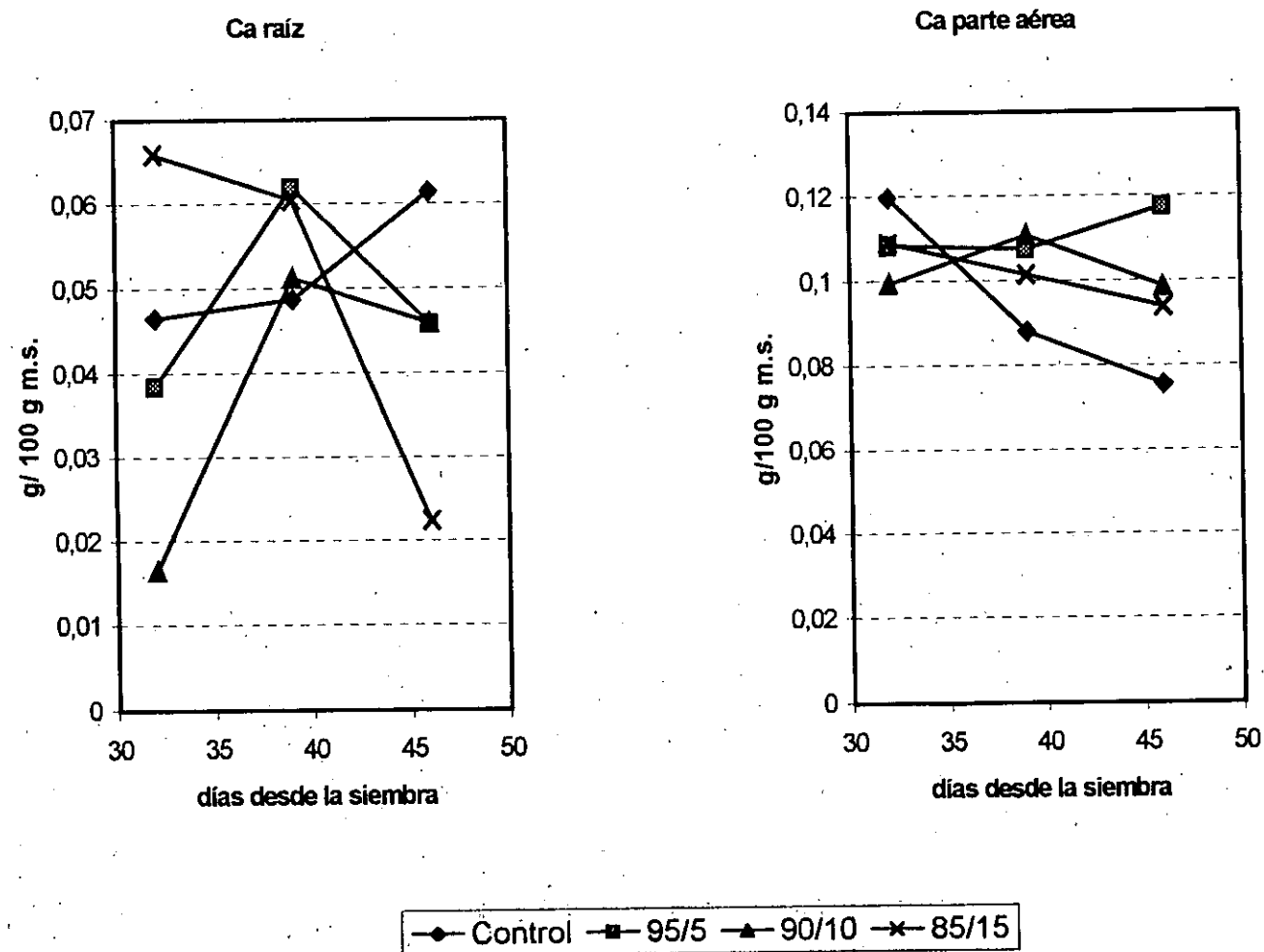
## VI. Validación agronómica de los productos

Figura 84 Concentración de K en plantas de tomate cultivadas en invernadero comercial (Almería)



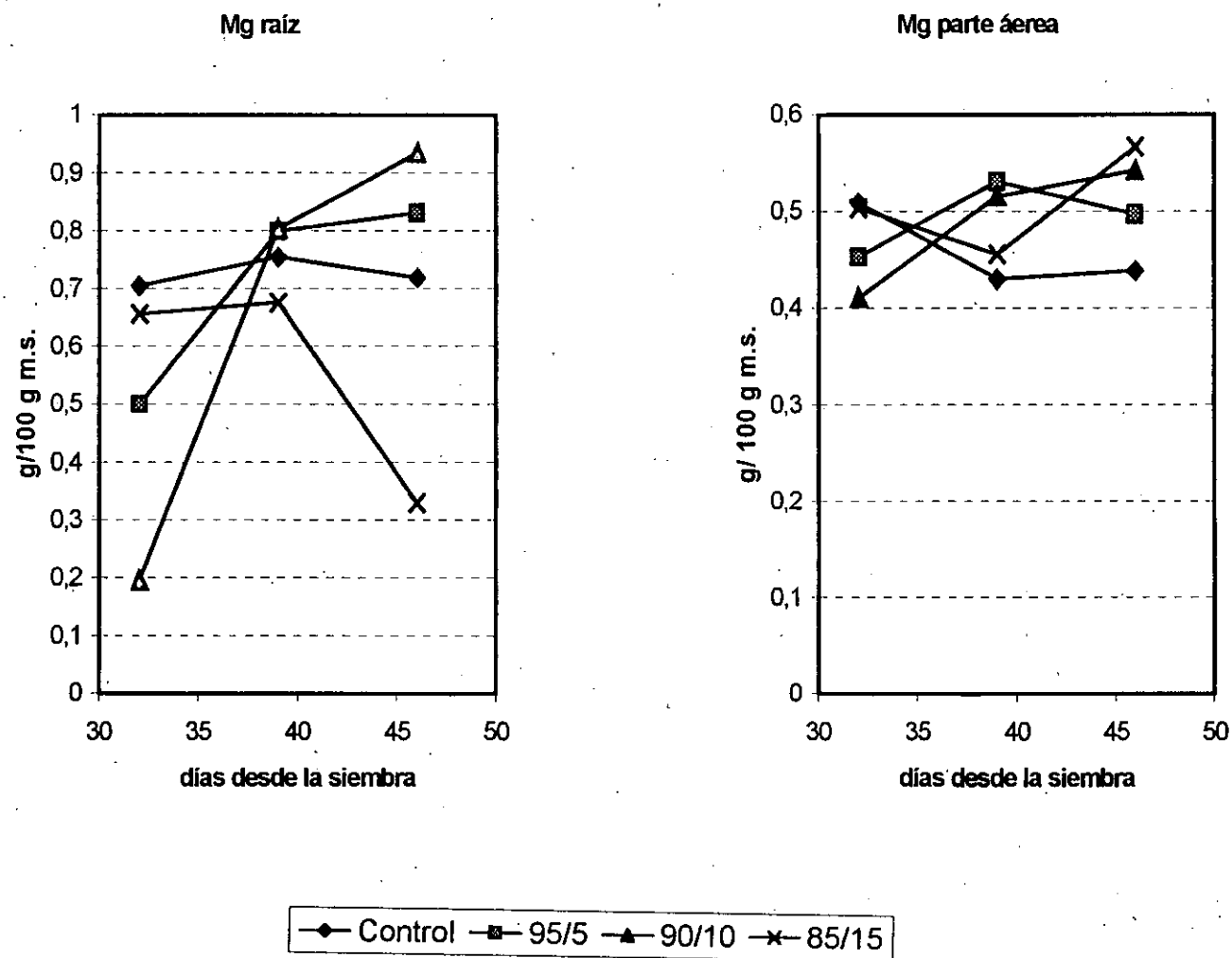
## VI. Validación agronómica de los productos

Figura 85 Concentración de Ca en plantas de tomate cultivadas en invernadero comercial (Almería).



## VI. Validación agronómica de los productos

**Figura 86** Concentración de Mg en plantas de tomate cultivadas en invernadero comercial (Almería).





## VI. Validación agronómica de los productos

En cuanto al P, la figura 83 recoge la concentración en parte aérea y en raíz. Resultados que coinciden con los obtenidos en plántulas de pimiento, siendo el control el que mayor valores alcanzó de este macronutriente. De modo inverso, la presencia de Aquamato férrico en la mezcla de sustrato aminoró la absorción de P, tanto en parte aérea como en raíz.

Al igual que se ha descrito en plántulas de pimiento, como indican los contenidos de K mostrados en la figura 84, la repercusión de los tratamientos sobre los niveles foliares y en raíz de este macronutriente tampoco parece en esta ocasión relevante.

Con relación a los niveles de Ca, su evolución tanto en raíz como en la parte aérea, está recogida en la figura 85. En ella puede observarse que la tendencia descrita por las plántulas de tomate al inicio es la opuesta a la obtenida al finalizar el ensayo, y tampoco se corresponde con la mostrada en plántulas de pimiento. Si bien todos los tratamientos incrementaron la concentración de este macronutriente en parte aérea, en plántulas de tomate este aumento se produce en proporción inversa al porcentaje de Aquamato férrico utilizado en la mezcla. Por el contrario, el contenido de Ca en raíz no aumenta.

Al final del ensayo de tomate se confirma la tendencia descrita en las plantas de pimiento para los contenidos foliares de Mg, mientras que en los dos muestreos anteriores no se advierte ningún efecto digno de mención. La figura 86 muestra que al inicio del ensayo, tanto en raíz como en parte aérea, el control tiene concentraciones mayores de Mg que las obtenidas en los demás tratamientos. En todos los casos, el efecto del tratamiento sobre el nivel Mg, fue directamente proporcional al contenido de Aquamato férrico en la mezcla. En cualquier caso, respecto de los contenidos de Mg en raíz no se refleja en la experiencia una tendencia definida, a excepción de los efectos ya referidos que se producen en los momentos iniciales del ensayo.

### *B) Micronutrientes*

Los contenidos foliares de los micronutrientes denotaron un comportamiento similar al descrito en el ensayo de pimiento. Su concentración foliar se encontraba dentro de los

## VI. Validación agronómica de los productos

intervalos definidos como suficientes por Jones y col. (1991), con algunas excepciones que se irán detallando a continuación.

Al inicio del ensayo, el contenido de hierro foliar (figura 87) alcanzaba niveles elevados, que disminuyeron drásticamente al final del ensayo, especialmente en el control y en el tratamiento 85:15. La tendencia se corresponde con la descrita para las plántulas de pimiento, resultando al final del ensayo el tratamiento 90:10 el que se manifestó más efectivo. Sin embargo, no se observa incremento de Fe en raíz, a excepción de lo apreciado en el último muestreo en el tratamiento 90:10.

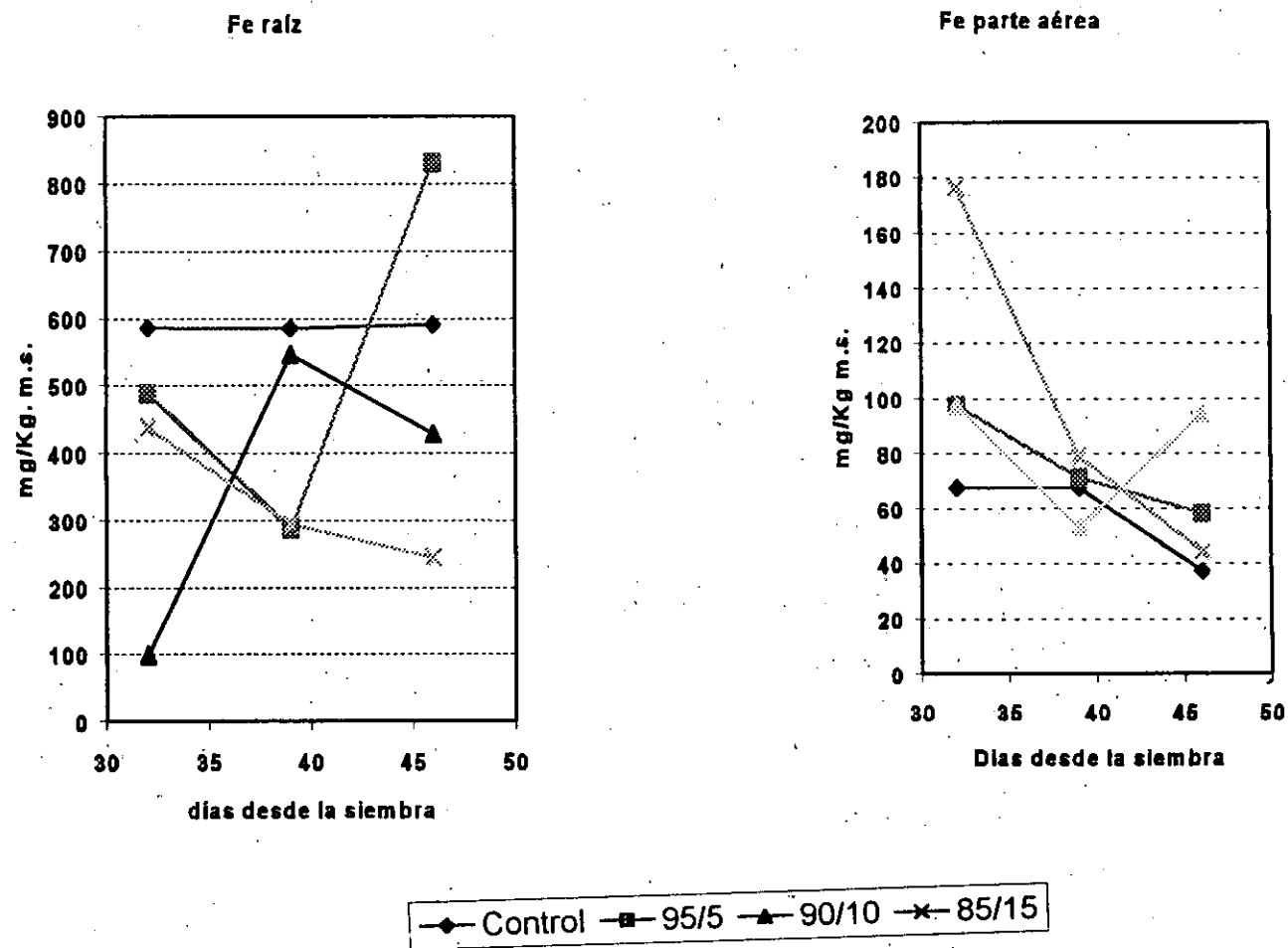
La influencia de los tratamientos sobre la concentración de Mn en parte aérea y radicular es diversa en función del momento en que se realizó el muestreo. La figura 88 muestra que los tratamientos 95:5 y 90:10 incrementaron los niveles de este elemento en los tres muestreos realizados, tanto en parte aérea como en raíz, mientras que se observó una disminución de este micronutriente en la parte aérea en el tratamiento 85:15 y en el control.

Aludiendo a continuación al Cu, este elemento presentó contenidos foliares diferentes al final del ensayo respecto de los mostrados a su inicio, que lógicamente son consecuencia del efecto de los tratamientos. Los niveles de este elemento encontrados en los tratamientos 90:10, 85:15 y control superan los  $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , que es el límite de toxicidad descrito por Jones y col. (1991). A medida que avanza la experiencia, esta concentración decrece espectacularmente a niveles considerados normales, alcanzando todos los tratamientos una misma concentración final. En raíz la tendencia es similar, aunque en todos los tratamientos se constata una disminución en relación con el de control.

Para concluir el análisis del efecto de los tratamientos sobre la nutrición de micronutrientes, se comentará el caso del Zn. En todos los casos se incrementaron los niveles de este micronutriente respecto el control. Ahora bien, el efecto del Aquamato férrico en el sustrato parece depender del tiempo de duración de los tratamientos. En parte aérea, inicialmente se observa un incremento del metal proporcional al contenido de Aquamato férrico en la mezcla, que se invierte al final del ensayo.

VI Validación agronómica de los productos

**Figura 87** Concentración de Fe en plantas de tomate cultivadas en invernadero conercial (Almería).



## VI Validación agronómica de los productos

**Figura 88** Concentración de Mn en plantas de tomate cultivadas en invernadero comercial (Almería).

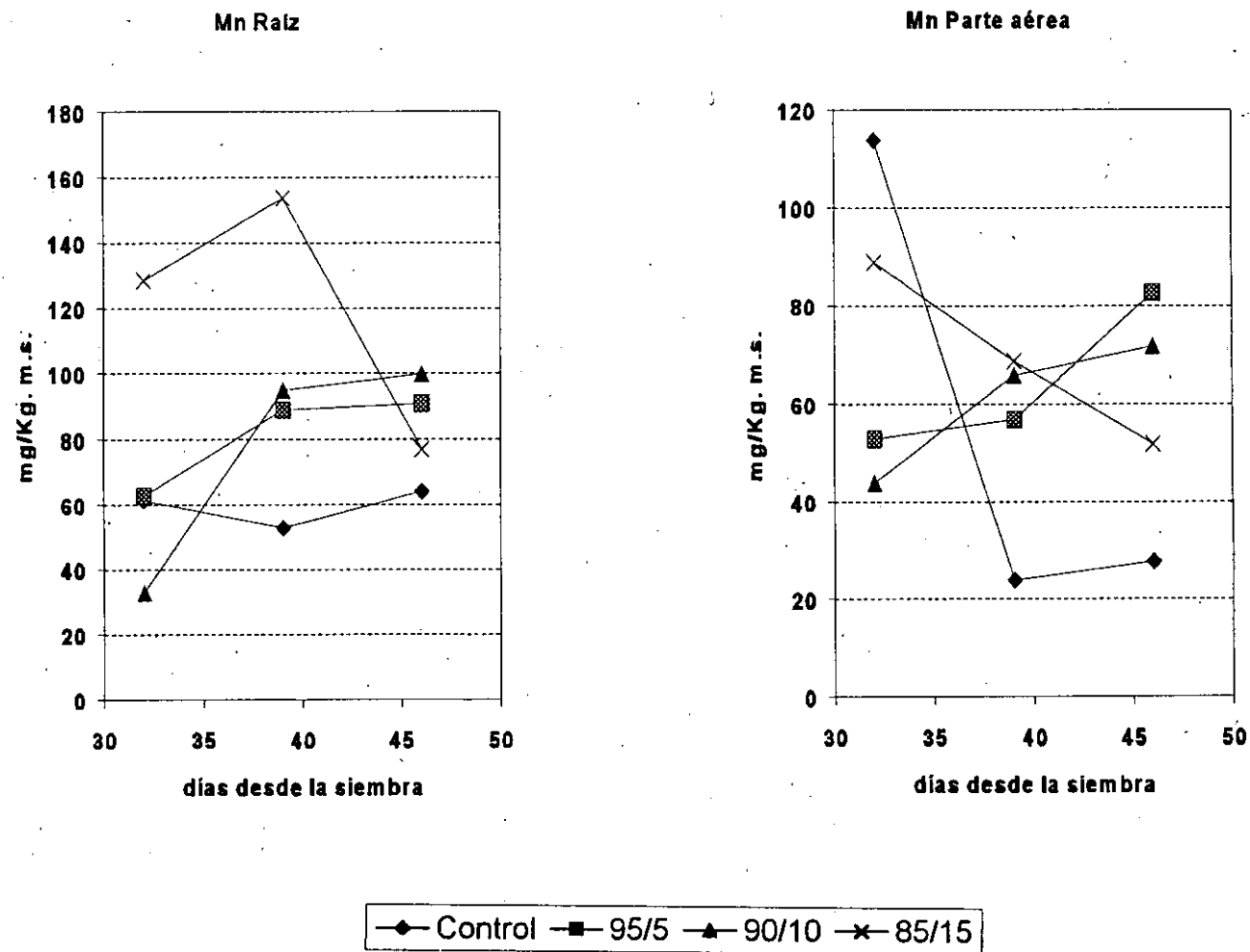
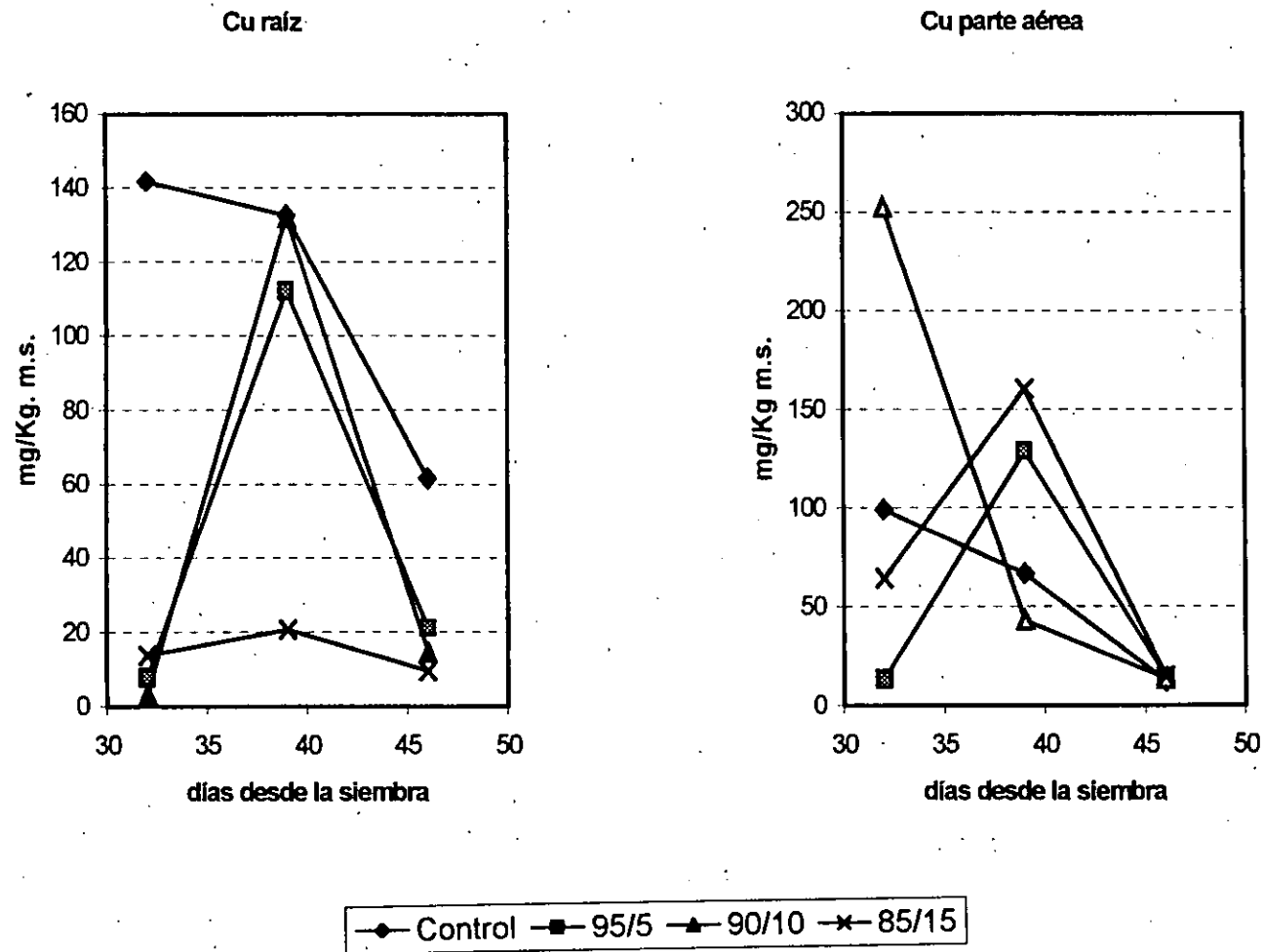
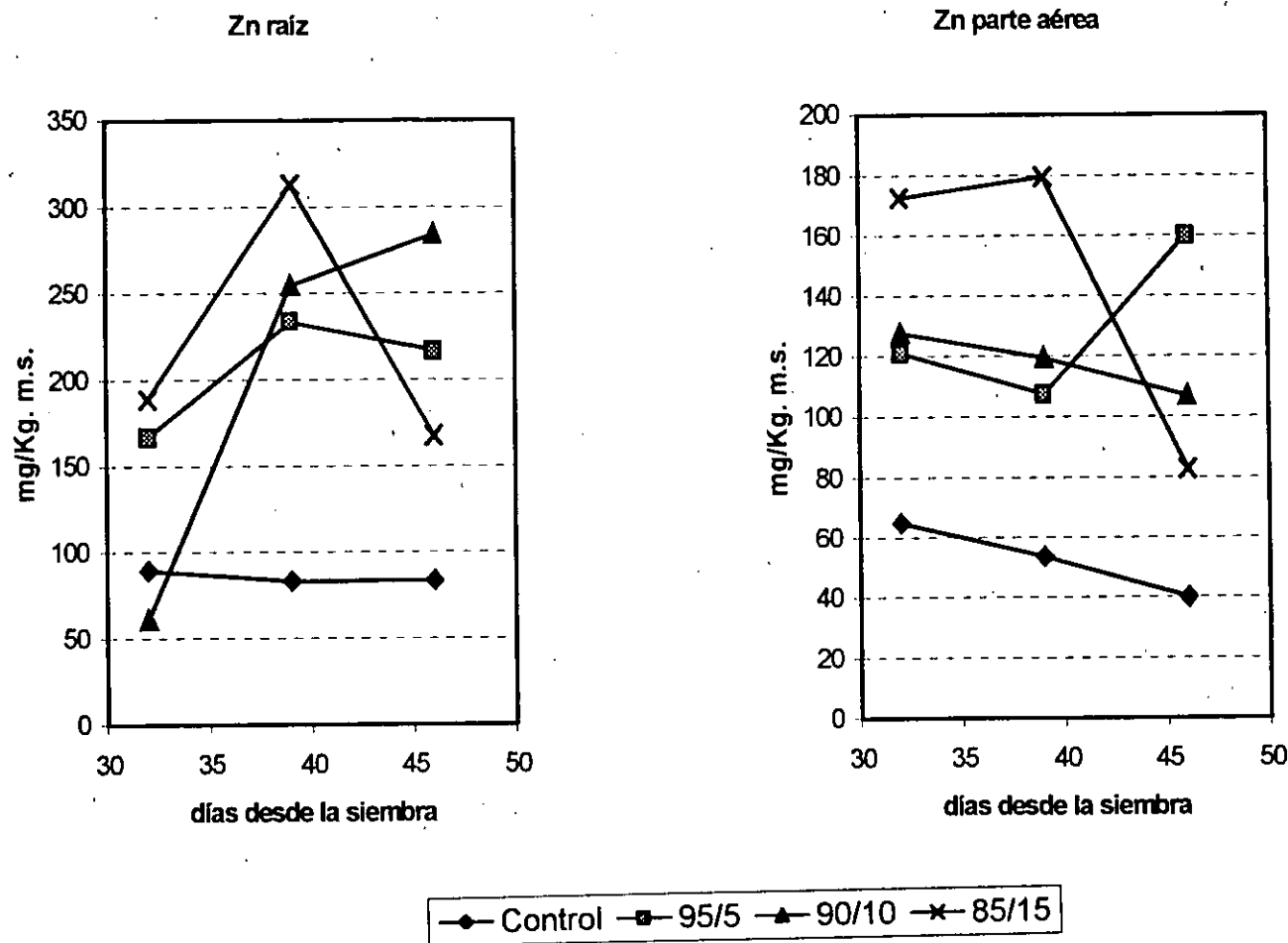


Figura 89 Concentración de Cu en plantas de tomate cultivadas en invernadero comercial (Almería)



VI. Validación agronómica de los productos

Figura 90 Concentración de Zn en plantas de tomate cultivadas en invernadero comercial (Almería)



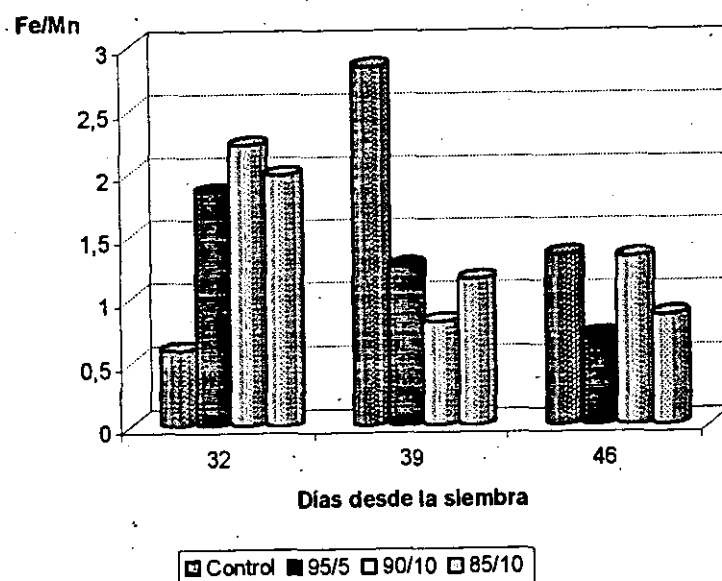
## VI. Validación agronómica de los productos

### 2.3.2.4. Influencia en la nutrición férrica

En este ensayo las relaciones entre elementos no mostraron una tendencia clara y definida. En general, las adiciones de Aquamato férrico en la mezcla de sustrato no implicaron una mejora de la nutrición férrica de las plántulas de tomate respecto del control. De hecho, la relación Fe/Mn, descrita en la figura 91, disminuyó en todos los casos, a excepción del primer muestreo correspondiente a los 32 días de la siembra. Comparativamente, se observa que inicialmente las plántulas germinadas con mezcla de Aquamato férrico y sustrato control presentaban un mejor estado férrico que las que habían crecido solamente en sustrato control. No obstante, a la vista de los resultados expuestos no cabe extraer conclusiones precisas acerca de cuál sea la influencia producida por la variación de las dosis de Aquamato férrico.

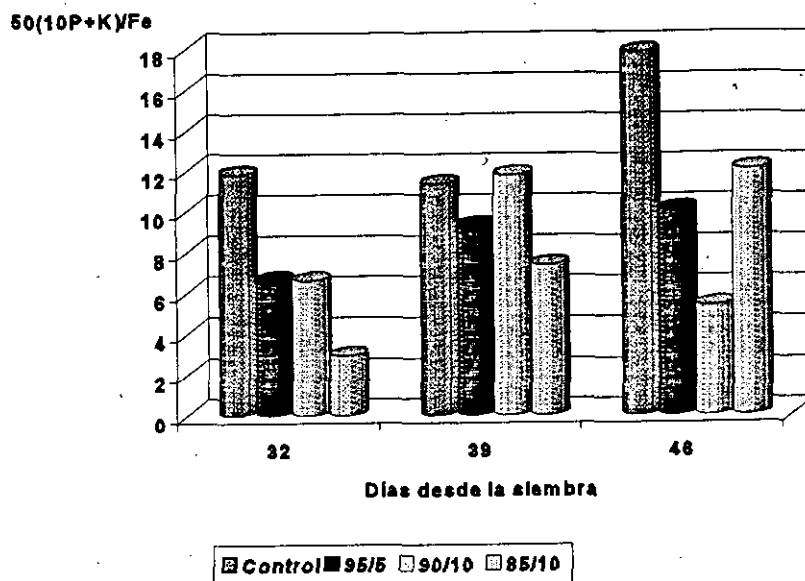
Estos resultados también se mantuvieron para la relación  $50(10P+K)/Fe$ , recogida en la figura 92. Los tratamientos presentaron valores inferiores al control revelando una mejora en la nutrición férrica. No obstante, tampoco las dosis mostraron una tendencia definida que permita apreciar diferencias respecto de las consecuencias de su variación.

**Figura 91** Relación Fe/Mn en hojas de plántulas de tomate cultivadas en Almería.



## VI. Validación agronómica de los productos

**Figura 92** Relación  $50(10P+K)/Fe$  para hojas de plántulas de tomate cultivadas en Almería



### 2.3.2.4. Resumen de resultados.

Se pueden resumir los resultados expuestos en este estudio en los siguientes puntos:

- La presencia de pequeñas cantidades de Aquamato férrico en la mezcla de sustrato utilizado en esta experiencia, no parece favorecer la germinación y posterior desarrollo de plántulas de tomate cv. *Royesta*, a pesar de que, se produce un incremento significativo del índice SPAD entre tratamientos y control, a medida que aumenta la proporción de éste producto en el sustrato.

- Con relación a la concentración de macronutrientes, se favorece la absorción radicular de N, y al contrario de lo que ocurría en plantas de pimiento, en esta ocasión dicho efecto beneficioso se mantiene en la parte aérea. También se incrementan los niveles de P en plántulas cultivadas en el sustrato control, pero si bien un aumento de Aquamató férrico en la mezcla favorece la absorción Mg en parte aérea, no ocurre lo mismo con el Ca.

- La presencia de pequeñas cantidades de Aquamato férrico en la mezcla de sustrato supuso un incremento de todos los micronutrientes en parte aérea y raíz, a excepción de Cu que no pareció verse afectado.



## VI. Validación agronómica de los productos

► Las relaciones entre elementos utilizadas para evaluar la eficacia de los tratamientos sobre la nutrición férrica indican que la existencia de Aquamato férrico en la mezcla de sustrato mejora la asimilación de este micronutriente, aunque los índices empleados pueden verse muy influenciados por el resto de las modificaciones nutricionales que tienen lugar.

### 2. 3. 3. Experiencia con pepino.

#### 2. 3. 3.1. Índice SPAD y pigmentos fotosintéticos

Los datos obtenidos para el índice SPAD y los pigmentos fotosintéticos correspondientes al análisis foliar de plantas de pepino, vienen dados se exponen en la tabla 68.

**Tabla 68** Resultados obtenidos para el Índice SPAD , clorofilas a y b y carotenos en hojas de pepino cultivadas en invernadero comercial. Letras diferentes en una misma columna denotan dferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

	7 días	28 días	49 días	70 días	91 días	<M>*
<b>Índice SPAD</b>						
Control	37,7ns	50,1ns	50,3ns	46,8ns	40,5ns	45,1 ns
TE+125	39,0	50,5	49,3	42,5	38,8	44,0
TE+250	37,5	48,2	48,4	45,1	41,8	44,3
<b>Clorofila a (mg·100 g<sup>-1</sup> mf)</b>						
Control	164ns	150ns	111ns	106ns	101ns	126 ns
TE+125	166	145	109	105	100	127
TE+250	152	141	108	106	102	122
<b>Clorofila b (mg·100 g<sup>-1</sup> mf)</b>						
Control	61,1ns	56,2ns	36,5ns	41,8ns	45,0ns	48,1 ns
TE+125	63,8	55,1	35,3	42,0	45,3	48,3
TE+250	58,0	56,5	35,7	44,0	42,2	47,3
<b>Carotenos (mg·100 g<sup>-1</sup> mf)</b>						
Control	61,1ns	56,2	36,5	41,8ns	45,0	42,4 ab
TE+125	63,8	55,1	35,3	42,0	45,3	43,8 a
TE+250	58,0	56,5	35,7	44,0	42,0	41,7 b

## VI. Validación agronómica de los productos

Con relación a estos valores del índice SPAD, no se observa una tendencia favorable a ninguno de los tratamientos, a excepción de los datos apreciados en el control cuando ya habían transcurrido 70 días desde el inicio de los tratamientos. Tampoco se manifestó una incidencia clara en el resto de los pigmentos fotosintéticos, salvo en relación con los carotenos, cuya síntesis se vio favorecida con el tratamiento TE+125 a lo largo del ensayo, especialmente a los 49 y 91 días desde el inicio de los tratamientos. En estos dos muestreos este efecto es, además, estadísticamente significativo.

### *2.3.3.2. Análisis mineral*

Los resultados correspondientes al análisis mineral de plantas de pepino vienen dadas en las tablas 69 y 70.

#### *A) Macronutrientes*

A diferencia de lo obtenido en los ensayos anteriores sobre tomate y pimiento, no existe un efecto de los tratamientos sobre la concentración de N en ninguno de los dos muestreos, según se recoge en la tabla 69.

Conforme a los datos de la referida tabla, en un primer momento tampoco se aprecia influencia de los tratamientos sobre la absorción del P. No obstante, a medida que transcurre el ensayo se confirman la tendencia descrita para las plántulas de pimiento y tomate. La presencia de Aquamato férrico en la mezcla de sustrato disminuye la absorción de este macronutriente.

Con relación al contenido en K, hasta el momento se habían encontrado niveles elevados de este macronutriente en planta no atribuibles al efecto de los tratamientos, ya que se presentaban igualmente en los controles. Ahora bien, en el caso del análisis foliar para plantas de pepino -ensayo que actualmente nos ocupa-, se aprecia un incremento significativo del tratamiento TE+125 que no se mantiene en el segundo muestreo, realizado a los 91 días desde el inicio de los tratamientos.

## VI. Validación agronómica de los productos

En la tabla 69, también se recogen las concentraciones foliares de Ca y Mg. En el primer muestreo, ninguno de estos dos macronutrientes se vio afectado por el efecto de los tratamientos, permaneciente esta misma circunstancia en relación con el contenido de Mg hasta el final del ensayo. Sin embargo, al final del ensayo, la presencia de Aquamato férrico favoreció la absorción de Ca de forma significativa respecto los controles. Este efecto es independiente de la dosis de producto utilizada, pues no existen diferencias significativas entre tratamientos.

**Tabla 69** Concentración foliar de macronutrientes ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  m.s.) en planta de pepino cultivadas en invernaderos comerciales (Almería). Letras diferentes en una misma columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ )

	49 días	79 días	<M>*
<b>N</b>			
Control	4,27 n.s.	3,21 n.s.	
TE+125	4,27	3,42	
TE+250	4,51	3,06	
<b>P</b>			
Control	0,466 n.s.	0,374 a	
TE+125	0,508	0,325 b	
TE+250	0,486	0,299 b	
<b>K</b>			
Control	2,21 b	1,85 n.s.	2,03 b
TE+125	2,24 a	1,91	2,18 a
TE+250	2,32 b	1,74	1,99 b
<b>Ca</b>			
Control	0,30 n.s.	0,58 b	
TE+125	0,28	0,68 a	
TE+250	0,27	0,67 a	
<b>Mg</b>			
Control	0,437 n.s.	1,16 n.s.	0,951 n.s.
TE+125	0,751	1,23	0,989
TE+250	0,724	1,24	0,979

<M>\* Medias d los muestreos

## VI. Validación agronómica de los productos

### *B) Micronutrientes*

La incidencia de los tratamientos sobre la absorción de micronutrientes en plantas de pepino no se correlaciona con lo obtenido en los ensayos vegetales descritos en plántulas de tomate y pimiento. En estos dos últimos supuestos, la adición de pequeñas cantidades de Aquamato férrico a la mezcla de sustrato supuso un incremento de estos elementos respecto del control. De forma que dicho efecto, incluso, mejoraba a medida que transcurría el ensayo.

**Tabla 70** Concentración foliar de micronutrientes (mg·Kg<sup>-1</sup> m.s.) en planta de pepino cultivadas en invernaderos comerciales (Almería). Letras diferentes en una misma columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ )

	49 días	91 días	<M>*
<b>Fe</b>			
Control	67,53 n.s	128 a	
TE+125	66,10	81,3 b	
TE+250	62,50	76,8 b	
<b>Mn</b>			
Control	123 n.s.	476 n.s.	299,7 a
TE+125	113	435	294,0 a
TE+250	126	448	287,2 a
<b>Cu</b>			
Control	10,0 n.s.	6,95 a	
TE+125	8,48	6,15 b	
TE+250	10,5	5,38 c	
<b>Zn</b>			
Control	55,6 n.s	146 a	
TE+125	52,6	133 b	
TE+250	54,1	122 b	

<M> Medias de los muestreos

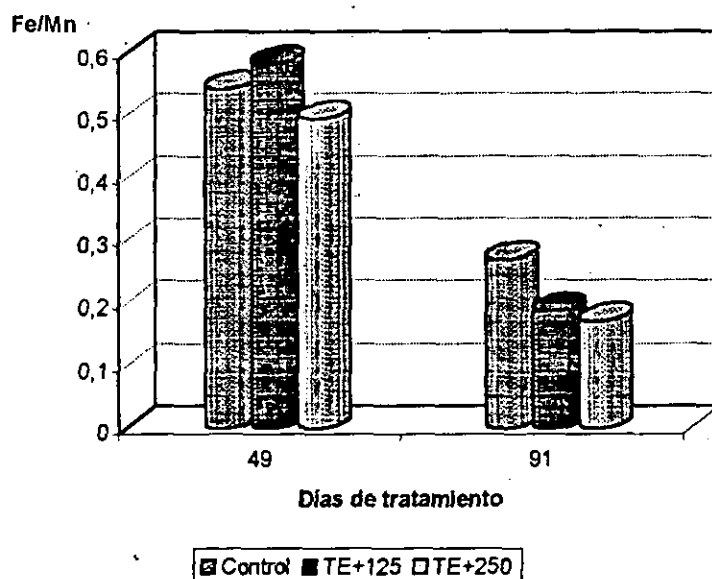
En las plantas de pepino, contrariamente, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control en ninguno de los micronutrientes evaluados a los 49 días de iniciarse los tratamientos. Este comportamiento se mantuvo por lo que hace alusión a la concentración de Mn hasta que finalizó el ensayo. Momento éste en el cual los controles

incrementaron significativamente los niveles foliares de Fe, Cu y Zn. La presencia de Aquamato férrico como sustrato o mezclado no produjo diferencias significativas, a excepción de lo apreciado respecto del Cu. Elemento éste respecto del que cabe concluir que se incrementa de forma inversamente proporcional a las dosis de Aquamato férrico aplicadas a la mezcla de sustrato.

#### 2.3.3.4. Influencia sobre la nutrición férrica

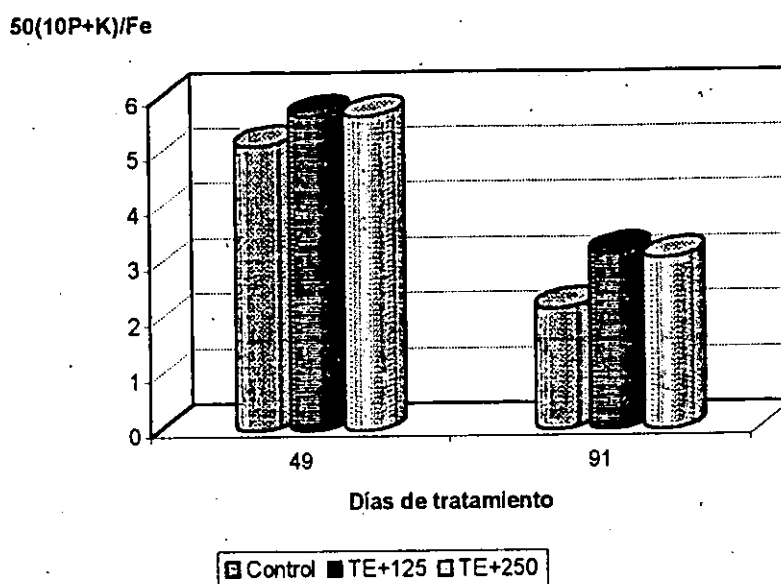
Las relaciones entre elementos que describen el estado de la nutrición férrica en plantas de pepino se recogen en las figuras 93 y 94. Como puede observarse, la relación Fe/Mn aumenta ligeramente en el tratamiento TE+125 al inicio del ensayo, mientras que cuando éste finaliza, el control presenta un incremento de este índice. Estos resultados no se confirman, en la otra relación utilizada:  $50(10P+K)/Fe$ , que presenta comportamiento completamente diferente. Teniendo en cuenta esta circunstancia, no se puede afirmar que no exista un efecto definido sobre los niveles de Fe, como consecuencia de la aplicación de Aquamato férrico en plantas de pepino, cultivadas en las condiciones descritas en este ensayo.

Figura 93 Relación Fe/Mn en hojas de plantas de pepino cultivadas en Almería



## VI. Validación agronómica de los productos

**Figura 94** Relación  $50(10P+K)/Fe$  en hojas de planta de pepino cultivadas en Almería



### *2.3.3.5. Producción y calidad de fruto*

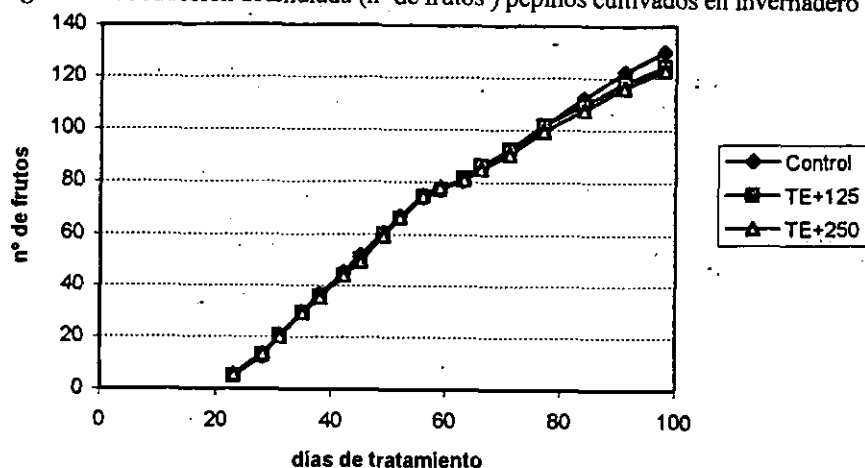
Ya se ha indicado en epígrafes anteriores el efecto de la sustancias húmicas sugerido por algunos autores respecto la producción y calidad de fruto. En el presente trabajo, ha sido destacada esta incidencia sobre el cultivo de melocotón, especialmente en producción, ya que no se obtuvieron mejoras con relación a la calidad del fruto, ni tampoco se manifestaron efectos positivos sobre la producción y calidad de las naranjas. A continuación, se expondrán los resultados obtenidos al evaluar la efectividad del Aquamato férrico sobre estos parámetros en cuanto a la experiencia desarrollada con pepino.

Con este fin, se valoró la producción acumulada de fruto de pepino en gramos; resultados que aparecen recogidos en la figura 95. De su contenido no se deduce ningún efecto de los tratamientos sobre este parámetro a lo largo de la experiencia.

Para evaluar la influencia de los tratamientos sobre la calidad del futo se midió, además, la firmeza de la pulpa, tanto en su zona pistilar, como central y peduncular; el pH de la misma, en la zona exterior y central; y para concluir, el porcentaje de sólidos solubles en grados BRIX.

## VI. Validación agronómica de los productos

Figura 95 Producción acumulada (nº de frutos) pepinos cultivados en invernadero comercial (Almería).



Los resultados estadísticos para los valores de la firmeza de pulpa manifiestan una interacción tratamiento muestreo significativa. En la figura 96 se exponen los valores medios para la firmeza de la pulpa en la zona pistilar, central y peduncular en cada uno de los muestreos realizados. Las mayores diferencias significativas entre tratamientos, según el test de Duncan, se encuentran en la zona pistilar. En este caso, cuatro de los ocho muestreos presentaron diferencias entre los tratamientos; en concreto los muestreos segundo, quinto, sexto y octavo. No obstante, ninguno de ellos define con claridad la influencia de los tratamientos sobre la firmeza de la pulpa en esta zona del fruto. Podría afirmarse que inicialmente, y como ya viene revelándose a lo largo de este trabajo, las cantidades menores actúan con mayor rapidez que las doble. En esta ocasión, es el tratamiento TE+150 el más beneficioso en los tres primeros muestreos, mientras que en el último se manifiesta con tal carácter el tratamiento TE+250.

Con relación a la firmeza de la pulpa en la zona central, sólo se encontraron diferencias en el segundo muestreo y debidas a la acción del tratamiento TE+250. Por último, se debe hacer referencia a los datos procedentes del análisis para la firmeza de la pulpa en la zona peduncular. En cuanto a este factor, se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control en el quinto y octavo muestreo, siendo el tratamiento más efectivo el TE+250.

VI Validación agronómica de los productos

Figura 96 Firmeza de la pulpa en pepinos cultivados en invernadero comercial (Almería).

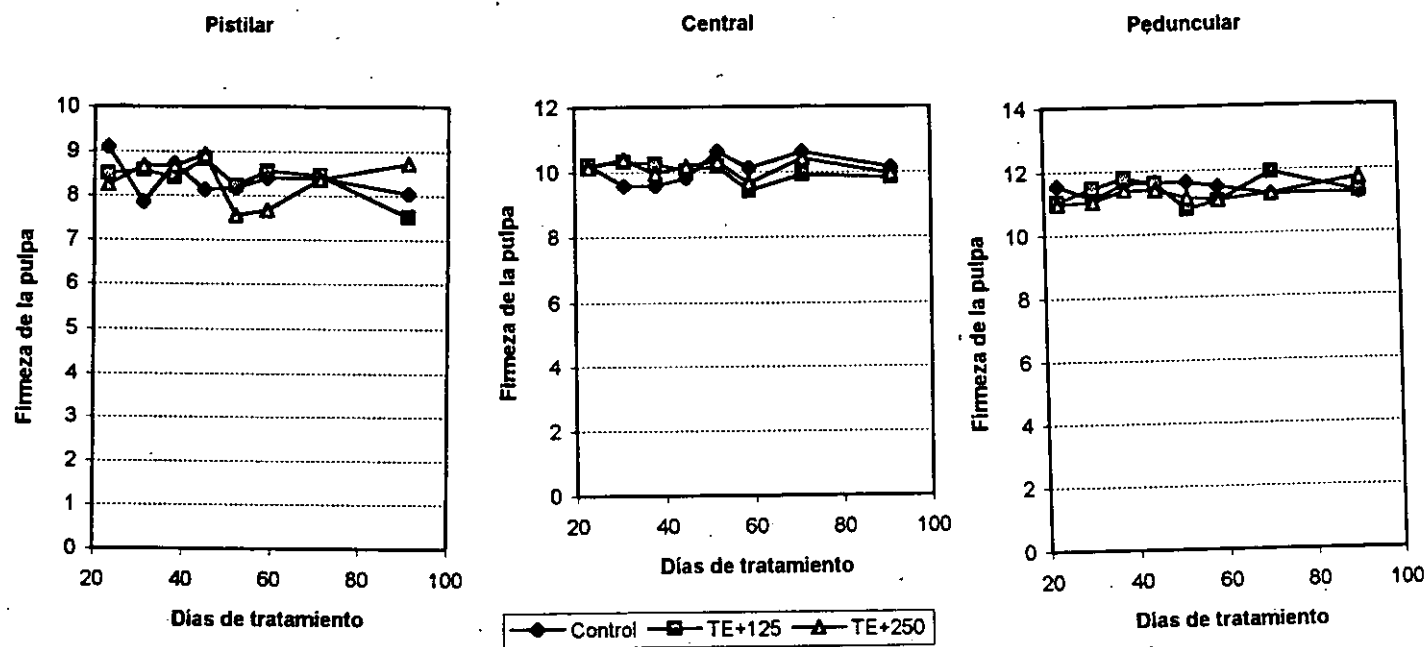
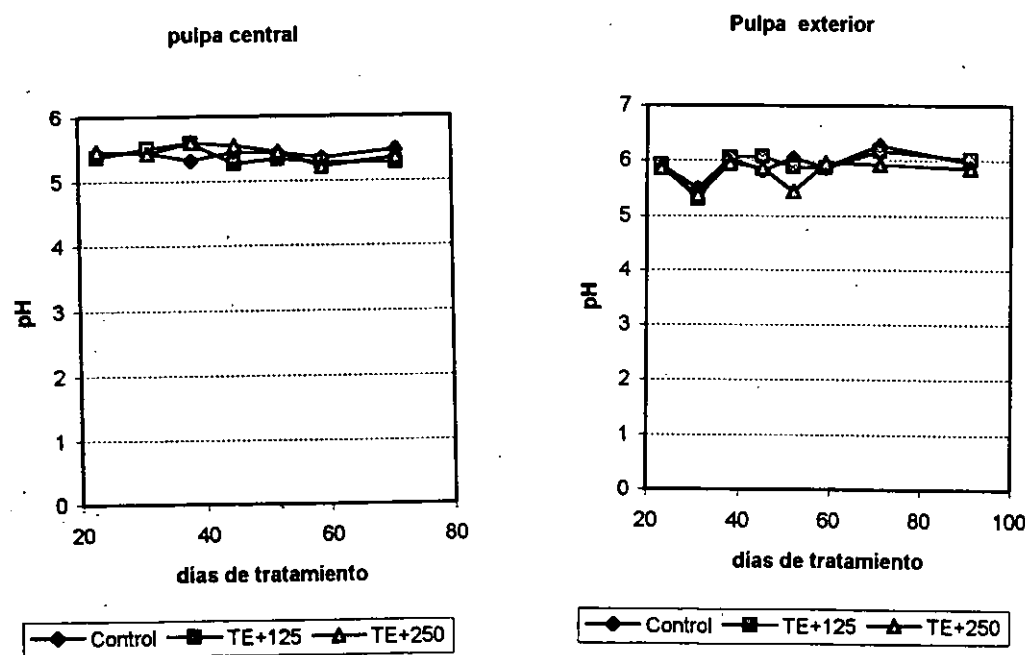


Figura 97 pH de la pulpa en pepinos cultivados en invernadero comercial (Almería).





## VI. Validación agronómica de los productos

► Si bien no se obtiene una respuesta directa de la aplicación de Aquamato férrico sobre la producción de fruto, puesto que no aumenta ni el número de gramos, ni de frutos respecto los controles en ninguno de los conteos realizados, si parecen beneficiar a su calidad, especialmente a la firmeza de la pulpa, que se vio favorecida por la presencia de Aquamato férrico en la mezcla. Del mismo modo, se vieron beneficiados los parámetros de pH y el número de sólidos solubles, aunque no de forma continuada. Se encontraron casos excepcionales preferentemente al final del ensayo y con las dosis elevadas.

► De estas consideraciones parece apropiada la utilización del Aquamato férrico como sustrato orgánico en cultivos hortícolas, como alternativa a los utilizados tradicionalmente.

### **2.4. INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN FOLIAR DEL AQUAMATO FÉRRICO SOBRE EL CULTIVO DE *Lycopersicon esculentum* Mill. var. *Lydia* EN HIDROPONÍA.**

En el siguiente apartado se detallarán los resultados de la aplicación foliar de un extracto acuoso procedente del Aquamato férrico sobre plantas de tomate cultivadas en condiciones controladas. Entre sus ventajas, además del hecho de poder ser usado en fertirrigación, se encontraría hipotética mayor capacidad de las aplicaciones foliares para solventar la clorosis férrica. El estudio correspondiente al análisis de la varianza y la aplicación del test de Duncan para los datos experimentales se encuentra en el disquete adjunto al ejemplar de esta memoria, ubicado en el directorio "A:\Extracto".

#### **2.4.1 Análisis de la disolución nutritiva**

El análisis de la disolución nutritiva permite comprender las tendencias seguidas por los nutrientes durante los tratamientos, así como los mecanismos de respuesta de la planta frente a las posibles deficiencias que se puedan producir. Es por tanto conveniente realizar medidas de pH, conductividad y contenido en Fe, e igualmente del resto de los macro y micronutrientes. Factores éstos cuyas relaciones con el Fe indican el estado nutricional de

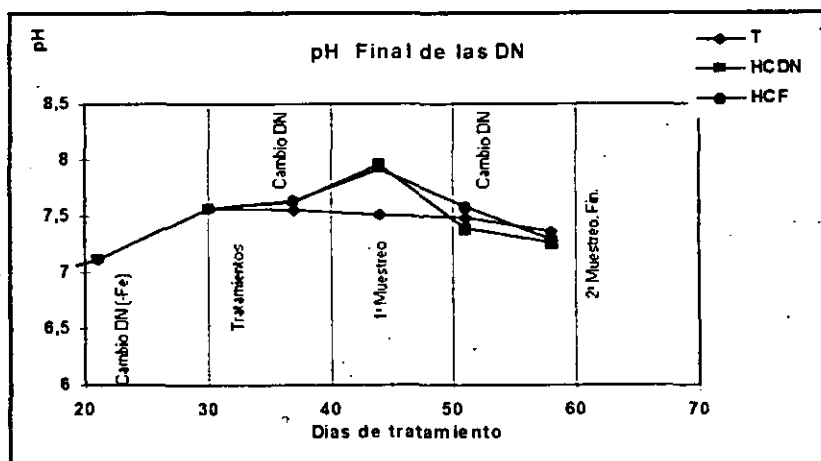
## VI. Validación agronómica de los productos

la planta frente a este último.

### 2.4.1.1 pH y conductividad

Las medidas de pH, mostradas en la figura 100, se realizaron en cada cambio de la disolución nutritiva, efectuándose tanto sobre la disolución nueva como sobre la que era retirada. Inicialmente todas las disoluciones se ajustaron a pH 6,5 y se adicionaron 1,0 g de  $\text{CaCO}_3$ , por lo que el pH inicial se incrementaba ligeramente y la disolución nutritiva se mantenía en condiciones alcalinas, donde la planta presenta los problemas de deficiencia de Fe. El efecto de los tratamientos no se ve reflejado en las variaciones de pH de la disolución nutritiva, a excepción de un ligero incremento - aproximadamente hasta 8 durante el primer muestreo - producido por el efecto tampón del  $\text{CaCO}_3$ .

**Figura 100** Medida del pH final de las disoluciones nutritivas para cada tratamiento y etapa del cultivo



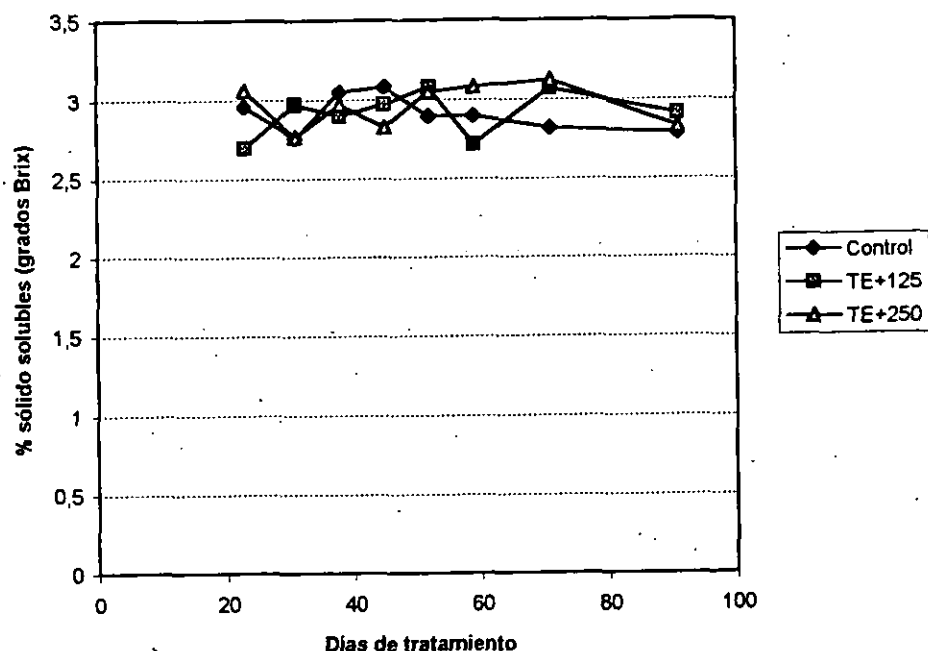
De forma análoga a la medida de pH, se evaluó la conductividad eléctrica de las disoluciones, tanto en la disolución de partida como en la desechada (figura 101). Tampoco se observan variaciones importantes debidas a los tratamientos. La conductividad inicial era próxima a  $2300 \mu\text{S}/\text{cm}$ , experimentando un descenso importante en las disoluciones retiradas que era atribuible a la acumulación de los nutrientes en el sustrato, ya que se fue recuperando el agua consumida por la transpiración de las plantas a lo largo del ensayo. La evolución de la conductividad con el tiempo es la normal en este tipo de ensayos; se produce un descenso a medida que se desarrolla, debido al consumo de las sales

## VI Validación agronómica de los productos

El segundo parámetro de calidad de fruto estudiado fue el pH de la pulpa que viene indicado en la figura 97. Las mayores diferencias en este valor se manifiestan respecto de los datos referentes al pH de la zona central, si bien tampoco se observa una tendencia clara, a salvo lo observado en el primer y el último muestreo, en los que el pH más elevado lo presentaron aquellos frutos que habían sido tratados con TE+250. Aunque, ha de señalarse que no mostraron diferencias significativas respecto al control. Sí existen, por el contrario, diferencias en el efecto producido según cual sea la proporción de Aquamato férrico en la mezcla.

Únicamente en un muestreo -el séptimo- los tratamientos incidieron significativamente sobre el valor del pH en la zona exterior de la pulpa, mostrando el control los valores más elevados. En esta ocasión no se manifestaron, sin embargo, diferencias en función de las dosis de Aquamato férrico empleadas en cada uno de los tratamientos.

**Figura 99** Porcentaje de sólidos solubles (grados brix) en pulpa de pepinos cultivados en invernadero comercial (Almería).



Para finalizar el estudio de calidad de fruto se midió el número de sólidos solubles en grados BRIX, que se encuentran referidos en la figura 99. De su examen no se obtiene un efecto significativo de los tratamientos sobre este parámetro. Solamente parece destacable que en el día 59 desde el inicio de los tratamientos, correspondiente al sexto

## VI. Validación agronómica de los productos

muestreo, el tratamiento TE+250 incrementa significativamente los grados BRIX respecto el TE+125.

### *2.3.3.6 Resumen de resultados*

Se pueden resumir los resultados más destacables obtenidos en la aplicación de Aquamato férrico a plantas de pepino cultivadas en retransplante sobre sustrato orgánico en los siguientes puntos:

- No se manifiesta una influencia del Aquamato férrico en el índice SPAD, ni en el resto de los pigmentos fotosintéticos estudiados, a excepción de los carotenos, cuya síntesis se vio favorecida por la presencia en la mezcla de sustrato.

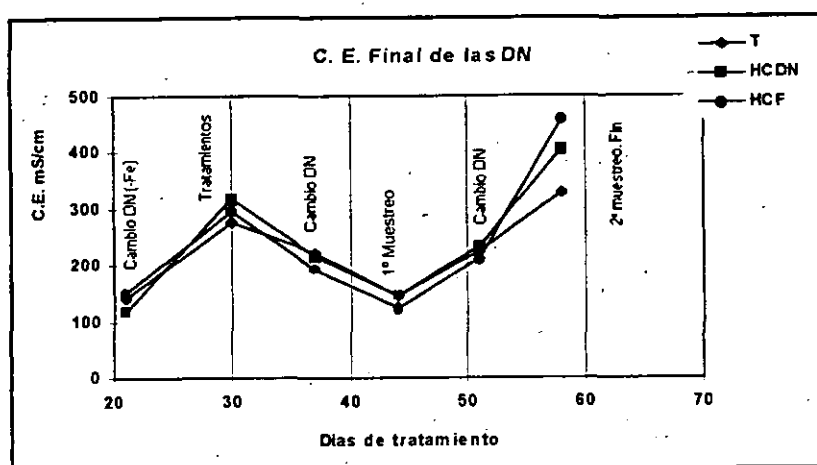
- Con relación a la mejora en la absorción de macronutrientes, no existe un efecto de los tratamientos sobre la concentración foliar de N, ni de Mg. De otro lado, las largas aplicaciones de Aquamato férrico disminuyen la absorción de P, con independencia de cual sea la dosis utilizada, confirmándose la tendencia descrita en plántulas de pimiento y tomate. En la experiencia sobre pepino aparece una ligera incidencia sobre el contenido foliar de K, que se incrementa cuando las aplicaciones son a corto plazo y en pequeñas dosis. Este efecto desaparece a medida que transcurre el tratamiento. Por último, se debe indicar que al final del ensayo, la presencia de Aquamato férrico favoreció la absorción de Ca de forma significativa respecto los controles. Efecto que es independiente del uso de Aquamato férrico en la mezcla o como alternativa al sustrato orgánico, es decir TE+250.

- La influencia de los tratamientos sobre la absorción de micronutrientes en plantas de pepino no refleja el comportamiento descrito en plántulas de tomate y pimiento, en las que la adición de pequeñas cantidades de Aquamato férrico a la mezcla de sustrato favoreció su absorción. A excepción del nivel de Cu, que disminuyó su contenido cuando las plantas se cultivaron con Aquamato férrico en la mezcla de sustrato, no se observó un efecto sobre el resto de los micronutrientes. El cual tampoco se obtuvo en las relaciones que describen el estado nutricional del hierro.

## VI Validación agronómica de los productos

por la planta. Existe una elevación de la conductividad, y por tanto una menor exportación de sales de la disolución nutritiva, durante el final del periodo de deficiencia y al final de los tratamientos. Lo que implicará una menor necesidad nutricional de la planta, causada en el primer caso por la ralentización de las funciones fisiológicas de la planta ante el estado de deficiencia, y por lo tanto de estrés. En el segundo caso, sería consecuencia del periodo de maduración donde las necesidades de la planta son menores.

**Figura 101** Medida de la conductividad final (C.E. mS/cm) de las disoluciones nutritivas para cada tratamiento y etapa del cultivo



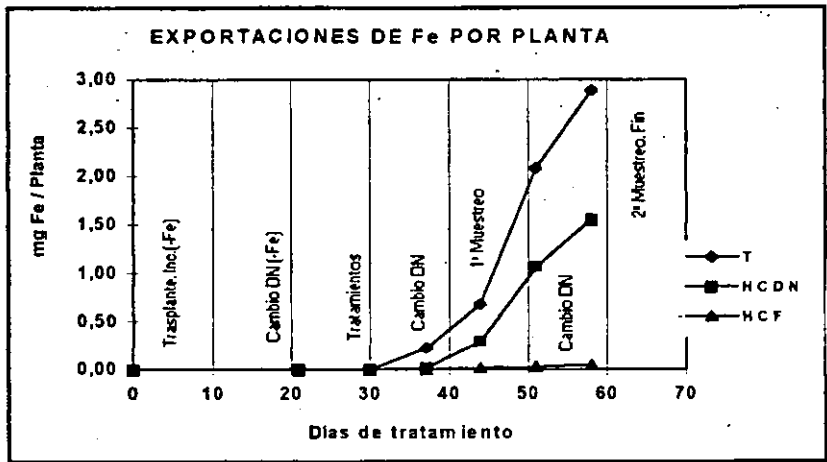
### **2.4.1.2 Contenido de micronutrientes.**

Los contenidos acumulados de micronutrientes en cada tratamiento se muestran en las figuras 102 a 105.

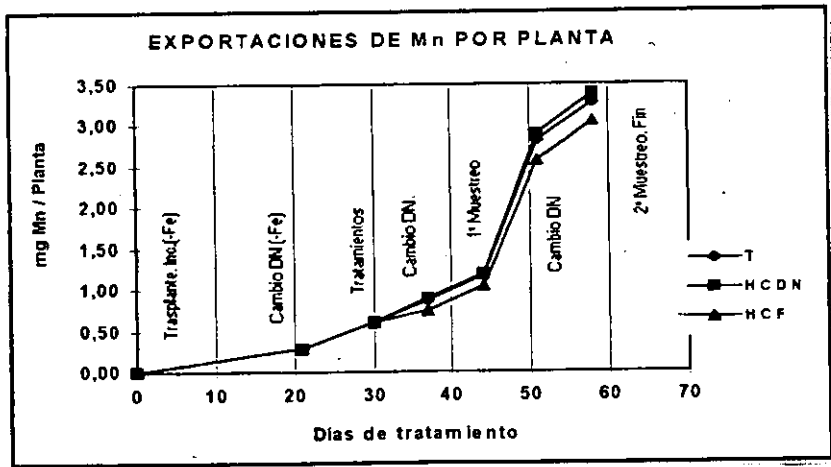
Las exportaciones de Fe (figura 102) por las plantas del testigo son significativamente superiores respecto de las ejercidas por tratamiento el HCDN. Después del periodo de deficiencia, la pendiente de la curva de exportación se incrementa como consecuencia de las necesidades nutricionales de la planta, que son mayores tras la carencia de Fe y coincidiendo con los periodos de floración y de fructificación de las plantas.

**VI Validación agronómica de los productos**

**Figura102** Exportaciones de Fe por planta y para cada tratamiento.



**Figura103** Exportaciones de Mn por planta y para cada tratamiento



## VI. Validación agronómica de los productos

Figura104 exportaciones de Cu por planta y para cada tratamiento

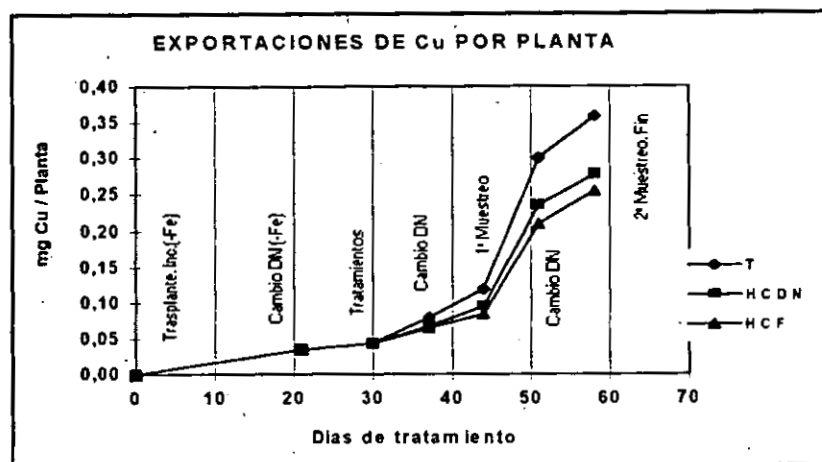
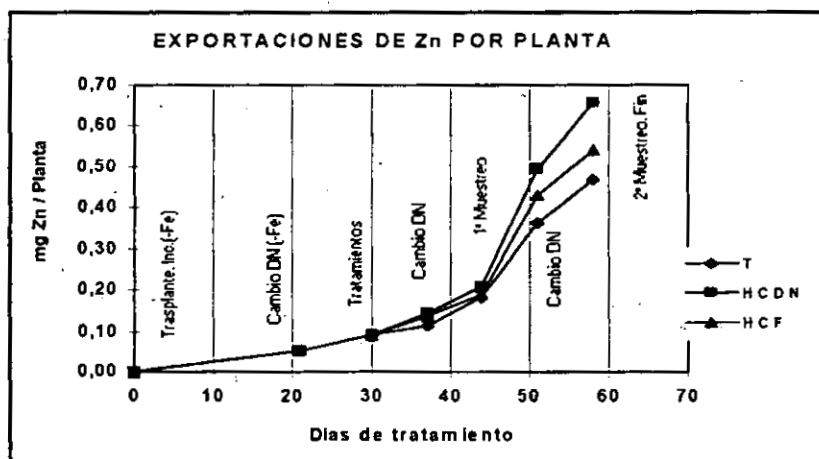


Figura105 Exportaciones de Zn por planta y para cada tratamiento



## **VI. Validación agronómica de los productos**

No se observa efecto significativo de los tratamientos sobre las exportaciones de Mn por la planta como viene indicado en la figura 103, si bien mayor el valor se corresponde con el tratamiento HCDN.

Por el contrario, se manifiestan diferencias significativas entre las exportaciones de Cu por las plantas testigo y las tratadas foliarmente. La presencia de quelato sintético o humato en la disolución nutritiva facilita la absorción de Cu por el desplazamiento del Fe. Esta circunstancia explica las menores exportaciones producidas por el tratamiento HCF.

Para finalizar la exposición de los resultados concernientes a la exportación de micronutrientes por la planta, la figura 105 muestra las correspondientes al Zn. En esta ocasión, los valores menores coinciden con los obtenidos para las plantas testigo, mientras que las aplicaciones del humato-citrato en disolución nutritiva presentaron las mayores exportaciones de este elemento.

Debe valorarse que la tendencia manifestada en las gráficas de exportación de micronutrientes en cada tratamiento es la misma durante todo el ensayo, y que al final de éste las plantas consiguen su madurez puesto que alcanzan los 96 días de vida.

### **2.4.2 Parámetros de crecimiento**

Con objeto de valorar la influencia de la aplicación foliar sobre el crecimiento de plantas de tomate, se siguieron los criterios descritos en los anteriores ensayos biológicos por lo que fueron evaluadas las longitudes totales de la raíz y de la parte aérea, y el peso fresco y seco de las raíces, hojas, y tallos.

Los resultados correspondientes al peso fresco y al peso seco para plántulas de tomate se exponen en las figuras 106 y 107. No se encontraron diferencias significativas ni entre tratamientos ni entre muestreos, tras la realización de test de Duncan, aunque los dos tratamientos vinculados al Aquamato férrico incrementaron el peso fresco y seco de las plántulas de tomate respecto del tratamiento testigo. Además, en el segundo muestreo el tratamiento testigo no incrementó el peso total de la planta con respecto al primero mientras



## VI Validación agronómica de los productos

que los otros dos tratamientos sí lo aumentaron.

Estas diferencias no son significativas dada la importante variabilidad encontrada en los resultados pero son especialmente destacables en el muestreo indicado.

Figura 106 Peso fresco de plantas de pimiento cultivadas en invernadero de investigación

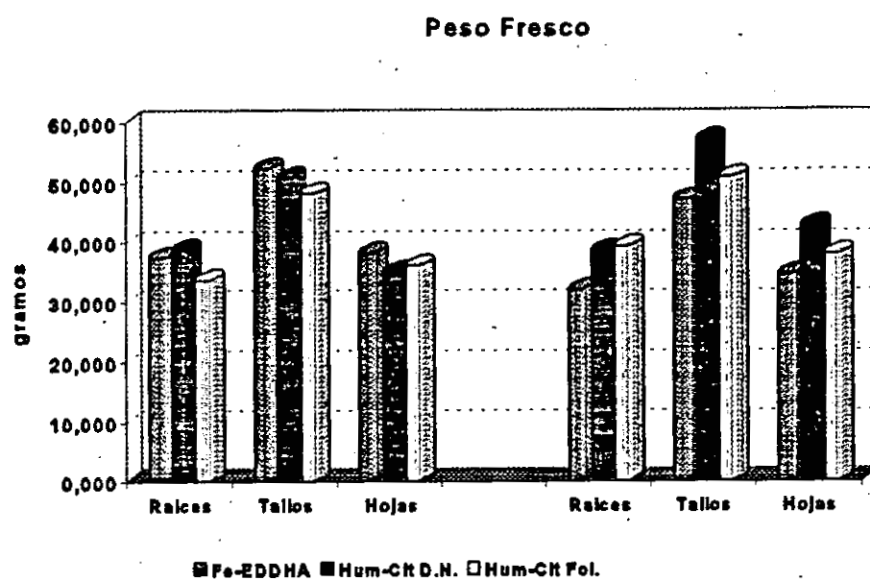
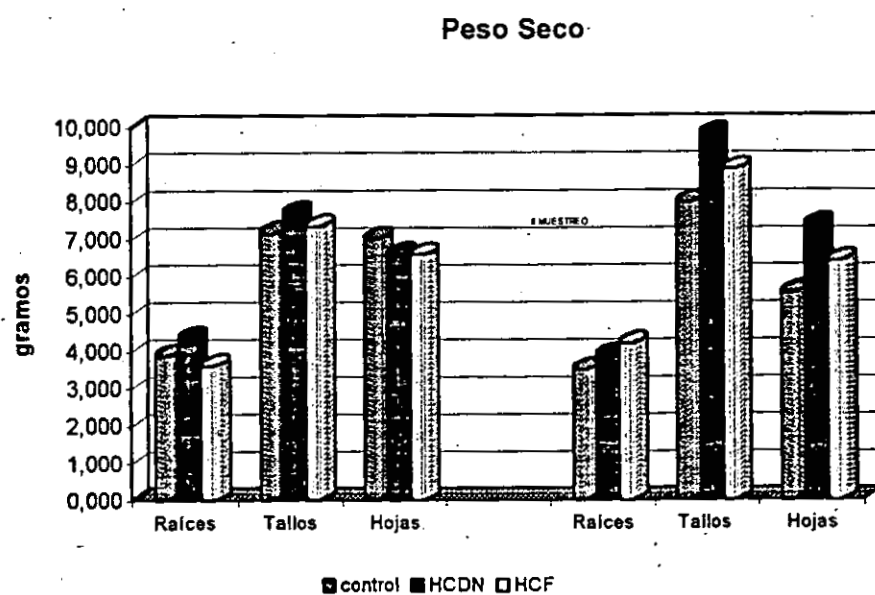


Figura 107 peso seco de plantas de tomate cultivadas en invernadero de investigación



## VI. Validación agronómica de los productos

Además del peso de planta, se estudió el efecto de la aplicación del Aquamato férrico extraído en medio básico sobre la longitud de la raíz y de la parte foliar. En esta ocasión, tampoco se manifestaron interacciones x tratamiento muestreo, ni se encontraron efectos significativos de los tratamientos como puede verse en la tabla 71. Solamente merece ser subrayado, que el tratamiento más efectivo para incrementar la longitud de la raíz fueron las aplicaciones foliares del Aquamato férrico-Citrato en disolución nutritiva y por contrapartida fueron las aplicaciones en la disolución nutritiva de este mismo producto las que más influyeron en el desarrollo de la parte aérea.

**Tabla 60** Resultados correspondientes a las medias de la longitud de raíz y parte aérea para cada tratamiento y muestreos. ( $\alpha=0,05$ )

	Longitud raíz			Longitud parte aérea		
	I	II	<M>*	I	II	<M>*
Fe-EDDHA	20,50 n.s.	18,50 n.s.	19,50 n.s.	64,75 n.s.	63,13 n.s.	63,94 n.s.
HCDN	19,63	18,63	19,12	65,00	65,13	65,06
HCF	20,25	20,38	20,00	61,50	61,13	63,06

<M>\* Medias entre muestreos

### 2.4.3. Análisis mineral

#### 2.4.3.1 Macronutrientes

Los resultados correspondientes al contenido total de macronutrientes en el ensayo de aplicación foliar de un extracto procedente del Aquamato férrico sobre plántulas de tomate se relacionan en la tabla 72. El análisis de la varianza pone de manifiesto la ausencia de interacción tratamiento x muestreo tanto en raíz, como en tallo y en hoja de plantas de tomate. Tan sólo se produjo efecto significativo de los tratamientos sobre las concentraciones de N y Mg, sin apreciarse diferencias valorables en el resto de los elementos.

## VI. Validación agronómica de los productos

La concentración de N decrece a lo largo del ensayo, siendo en el segundo muestreo cuando se alcanzan las mayores diferencias entre tratamientos fundamentalmente, en raíces y en hojas, momento en el cual los controles presentaron los mayores niveles de este elemento respecto de los otros dos tratamientos. En raíces, los contenidos de este macronutriente se incrementaron significativamente, tanto en el control y como en la aplicación en disolución nutritiva del humato citrato, respecto de la aplicación foliar. Con referencia a la concentración de N en hoja, de nuevo, el control refleja los niveles más elevados y en los dos muestreos, siendo significativamente mayor respecto del tratamiento HCDN, pero no así con el tratamiento HCF.

Respecto a la evolución de los macronutrientes a lo largo del ensayo, en la tabla 72 se puede apreciar que, tanto el P como el K disminuyeron la concentración en raíces y en tallos durante el transcurso del experimento, mientras que la concentración de estos dos elementos en hoja aumentó. En el segundo muestreo, las plantas presentaban mayor número de frutos por lo que ha de tenerse en cuenta que estos presentan como características su capacidad para movilizar estos nutrientes. El contenido en Ca aumenta ligeramente en el segundo muestreo en raíz y en tallo, y en mayor medida en la hoja.

Como ya ha sido comprobado en ensayos anteriores, la aplicación del Aquamato férrico influye positivamente en la absorción de Mg. Este efecto es especialmente relevante en raíces y en tallos, y es independiente de la forma de aplicación del extracto. El aumento de la concentración de Mg en raíz respecto del control se manifiesta en el segundo muestreo, no existiendo diferencias significativas entre tratamiento en los estados iniciales.

### *2.4.3.2 Micronutrientes*

En la tabla 73 se relacionan las concentraciones de los micronutrientes en los distintos órganos de las plantas de tomate, en los dos muestreos realizados. Los micronutrientes presenta comportamientos similares a los que se habían observado en los anteriores ensayos vegetales. La interacción tratamiento x muestreo fue significativa para el contenido de Fe en tallo y en hoja, mientras que en esta última también lo fue la concentración de Zn. De otro lado, no se encontró efecto significativo de los tratamientos

# VI Validación agronómica de los productos

**Tabla 61** Concentración de macronutrientes totales (mg·100g<sup>-1</sup>) en raíces, tallos y hojas de plantas de tomate. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

N		P		K		Ca		Mg		<M>* Medias entre muestreos																																					
I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II																		
Control	1,70ns	1,69a	0,255ns	0,205ns	0,230 ns	0,88ns	0,76ns	0,82ns	0,77ns	0,84ns	0,81ns	0,345ns	0,315b	0,330b	HCDN	1,81	1,67a	0,267	0,220	0,234	0,88	0,79	0,84	0,76	0,80	0,78	0,335	0,387a	0,363a	HCF	1,81	1,47b	0,235	0,215	0,225	0,89	0,69	0,79	0,75	0,82	0,78	0,355	0,382a	0,368a			
Tallo																																															
Control	1,17ns	1,00ns	1,08ns	0,355ns	0,245ns	0,300 ns	2,08ns	1,49ns	1,79ns	1,19ns	1,22ns	1,20ns	0,340b	0,362b	0,351b	HCDN	1,25	1,01	1,13	0,347	0,275	0,311	2,01	1,67	1,84	1,28	1,33	1,30	0,370a	0,487a	0,429a	HCF	1,13	1,05	1,09	0,342	0,257	0,300	2,03	1,49	1,76	1,28	1,26	1,27	0,375a	0,470a	0,422a
Hoja																																															
Control	2,34ns	2,34a	0,242ns	0,282ns	0,262ns	1,03ns	1,07ns	1,05ns	2,27ns	3,57ns	2,92 ns	0,347ns	0,435	0,391ns	HCDN	2,26	1,78b	2,02b	0,265	0,282	0,273	0,94	1,02	0,98	2,47	3,95	3,21	0,362	0,457	0,410	HCF	2,17	2,04ab	2,11b	0,265	0,272	0,269	0,98	1,04	1,01	2,72	3,72	3,22	0,358	0,417	0,387	
<M>* Medias entre muestreos																																															

## VI. Validación agronómica de los productos

sobre los muestreos en el resto de los elementos y en los niveles de Fe en raíz. Si bien los tratamientos ejercieron una influencia mayor sobre el contenido en micronutrientes que la observada respecto de los macronutrientes.

Tal y como describe la tabla 73, el efecto del tratamiento foliar del humato-citrato sobre el contenido de Fe en las plantas de tomate se corresponde con el objetivo para el cual este producto ha sido diseñado, superan incluso al contenido de este micronutriente en plantas tratadas con Fe-EDDHA, que fue utilizado como testigo en este ensayo y es considerado como el quelato sintético más eficaz para la corrección de la clorosis férrica en suelos calizos (Wallace, 1983).

La interacción tratamiento x muestreos no fue significativa respecto del contenido de Fe en raíces. Dado que sí se apreció esta interacción en tallo y en hoja, los resultados se mostrarán de forma diferenciada para cada uno de los muestreos y en los tres casos, a fin de valorar el efecto de los tratamientos sobre la movilización de este micronutriente de la raíz a la parte aérea.

No se encontraron diferencias significativas en los contenidos en raíz a lo largo del ensayo, pero los valores mostrados en la tabla 73, denotan que el tratamiento foliar incrementó sensiblemente esta concentración a lo largo del ensayo, mientras que en el tratamiento control descendía. Esta apreciación es particularmente importante, pues indica que el Fe aplicado vía foliar se trasloca a las raíces, como consecuencia de la asimilación del nutriente por la planta. Con independencia de la raíz, la aplicación foliar fue la más eficaz para incrementar los niveles de Fe, tanto en tallo como hoja, pero los valores alcanzados en el segundo muestreo rozaron los límites de la toxicidad (Jones y col, 1991).

Hay que destacar que el efecto de la aplicación del complejo humato férrico en la disolución nutritiva no es equiparable al mostrado por las plantas testigo. Los niveles de Fe en raíz están próximos en los dos tratamientos, y a medida que transcurre el ensayo el tratamiento HCDN mejoran los niveles de este micronutriente en tallo, si bien no presenta diferencias significativas respecto del testigo en la concentración en hoja.

## VI. Validación agronómica de los productos

**Tabla 62** Contenido de micronutrientes (mg·Kg<sup>-1</sup> m.s) en raíces, tallos y hojas para cada tratamiento y muestreo. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

	Fe		Mn		Cu		Zn	
	I	II	I	II	I	II	I	II
<b>Raíz</b>								
Control	317ns	248ns	55,6ns	60,5a	11,0 a	9,83 n.s.	25,4ab	15,9ns
HCDN	291	291	48,6	45,7b	6,09 b	5,70	29,5a	13,9
HCF	319	338	51,6	53,3ab	6,05 b	7,66	22,0b	13,5
<b>Tallo</b>								
Control	32,5b	26,4c	55,9a	55,0a	4,80a	3,13 n.s	33,2ns	21,5ns
HCDN	22,3c	33,9b	47,1b	47,3b	3,47b	2,65	27,9	19,45
HCF	37a	51,7a	46,2b	45,0b	4,30ab	2,25	29,3	20,0
<b>Hoja</b>								
Control	45,2b	50,9b	101ns	158ns	4,59a	3,20ns	21,5ns	5,91b
HCDN	29,1b	29,4b	120	145	4,04ab	2,66	19,4	5,75b
HCF	153a	344a	93,8	158	3,22b	3,03	20,0	13,5a

En relación con el Mn, de los datos obtenidos no se deduce efecto de los tratamientos sobre la concentración de este elemento en hoja y en raíz, mientras que en el tallo existen diferencias significativas entre tratamientos. Cabe indicar que los niveles de Mn en hoja se incrementaron notablemente en el segundo muestreo, pero no se alcanzaron valores superiores a 250 mg·Kg<sup>-1</sup> m.s., considerados como límite de toxicidad. En tallo, se aprecia el antagonismo Fe/Mn, especialmente en la aplicación foliar del Aquamato férrico-citrato y el tratamiento testigo. El primero alcanzó las mayores concentraciones de Fe y ahora aparece como el de menor contenido en Mn. La tendencia contraria se observa en el testigo.

Finalmente, los contenidos de Cu y Zn aparecen indicados en la tabla 73. En el caso del Cu, de forma análoga a lo observado en el caso del Mn, los tratamientos presentan un menor contenido de Cu, tanto en raíz como en tallo y hoja. No obstante, a diferencia del Cu, el contenido de Mn en el primer muestreo es mayor que en el segundo.

## VI Validación agronómica de los productos

La variabilidad en el caso del Zn entre el control y los dos tratamientos hace de este micronutriente un caso singular. En el caso de la raíz, se absorbe mejor en el tratamiento humato-citrato férrico en disolución nutritiva que en la aplicación foliar, en el caso del tallo, no existen diferencias significativas en ningún momento del ensayo, y en el caso de la hoja, es la aplicación foliar la que tiene la mayor absorción de Zn, principalmente en el segundo muestreo.

En la figura 105 se indicaron las exportaciones de los micronutrientes de la disolución nutritiva en cada cambio. La disoluciones preparadas con Humato-citrato presentan concentraciones de Zn mayores que las detectadas en el resto de los tratamientos, como también es más elevado el consumo de este micronutriente. No es especialmente destacable el contenido nativo de Zn en el Aquamato férrico, como puede verse en la tabla 6 correspondiente al análisis del producto y que se encuentra incluida en el capítulo III "Caracterización de los productos", pero si se ha venido observando tanto en el ensayo realizado en Lleida como en los efectuados en Almería, que la presencia del Aquamato férrico favorece los niveles de este micronutriente.

### **2.4.5 Influencia sobre la nutrición férrica**

Al igual que en los anteriores ensayos se obtuvieron las relaciones que expresan el estado nutricional de las plantas de los distintos tratamientos.

En la figura 108 se expresa la relación Fe/Mn. A la vista de los resultados se observa que la mayor relación viene dada por las aplicaciones foliares del complejo humato-citrato, tanto en el primer como en el segundo muestreo, aunque en este último, este índice se incrementó en mayor medida. Los otros dos tratamientos también matuvieron la tendencia en los dos muestreos, presentando el control valores superiores en la relación Fe/Mn que los manifestados por el tratamiento del humato citrato en disolución nutritiva.

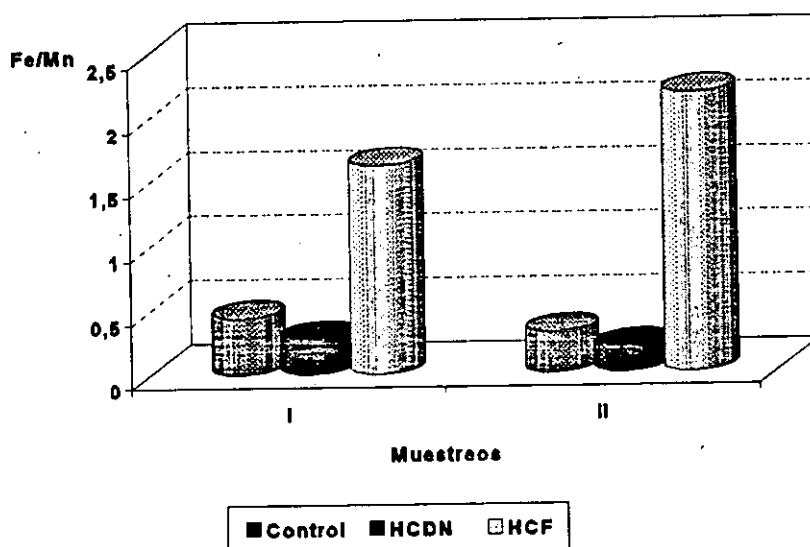
Con referencia a la relación  $50(10P+K)/Fe$  mostrada en la figura 108 y que ha sido objeto de estudio en los otros ensayos vegetales, la tendencia confirma este comportamiento. Los menores índices se reflejan en el tratamiento HCF, observándose

## VI Validación agronómica de los productos

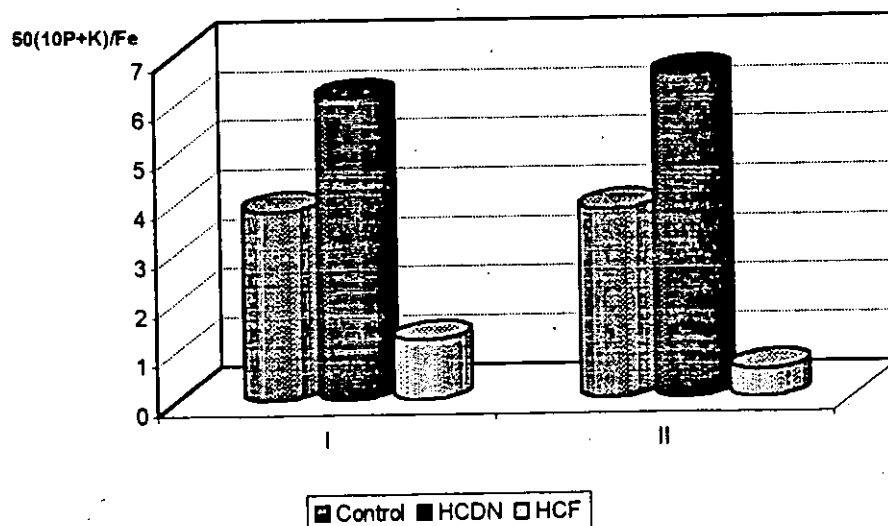
nuevamente este descenso en el segundo muestreo. Los otros dos tratamientos presentan valores más elevados respecto de este tratamiento, especialmente del denominado HCDN.

Como consecuencia, se puede destacar el efecto positivo de las aplicaciones foliares del complejo humato-citrato sobre la nutrición férrica de plantas de tomate cultivadas en hidroponia respecto de la aplicaciones en disolución nutritiva de este mismo complejo o de quelatos férricos de origen sintético.

**Figura 108** Relación Fe/Mn en plantas de tomate cultivadas en invernadero de investigación.



**Figura 109** Relación  $50(10P+K)/Fe$  en plantas de tomate cultivadas en invernadero de investigación.





#### 2.4.6 Resumen de resultados.

La aplicación foliar o en disolución nutritiva de un extracto acuoso procedente del Aquamato férrico y estabilizado con citrato ha influido positivamente sobre el desarrollo de plantas de tomate cultivadas en sustrato inerte. Este efecto ha incidido tanto sobre la longitud como en el peso de la parte aérea y de la raíz, manteniéndose en valores próximos a los encontrados en plantas tratadas con Fe-EDDHA.

No se ha observado, sin embargo una influencia de los tratamientos sobre la concentración de macronutrientes, a excepción del N y M. Las aplicaciones del complejo humato-citrato en disolución nutritiva favorecieron la absorción de N por la raíz que por el contrario, fue menor en las aplicaciones foliares. De modo opuesto, esta última forma de aplicación incrementó los niveles de N en hoja. No obstante, cabe destacar que en estos dos casos, los niveles de N en raíz y hoja se aproximaban a los mostrados por el control. Por otro lado, se favoreció la absorción de Mg por la raíz y al tallo con independencia de la forma de aplicación.

Con relación a los micronutrientes, la aplicación foliar del humato-citrato se confirma como la forma más eficaz para elevar los niveles foliares de Fe. Los niveles de este micronutriente en raíz, en aquellas plantas que fueron tratadas foliarmente, no revelaron diferencias significativas con los contenidos apreciados en aquellas que fueron tratadas con el Fe-EDDHA o el humato-citrato en disolución nutritiva, confirmando así que se produce la movilización del nutriente. Además, las buenas correlaciones encontradas entre los índices que describen el estado de nutrición férrica inducen a pensar que el Fe aplicado vía foliar puede ser fisiológicamente activo. De ahí, que deba evaluarse las dosis para evitar problemas derivados de la toxicidad.

Por último, se debe indicar que con la aplicación del extracto acuoso del Aquamato férrico se favorece la absorción radicular de los micronutrientes y que éstos pueden ser movilizados a otras partes de la planta, especialmente en el caso del Zn.

## **VII. DISCUSIÓN**

### **1. ADECUACIÓN DEL AQUAMATO FÉRRICO Y DEL DOLIRON COMO FERTILIZANTES**

Conforme a la legislación española, desde el punto de vista su aplicación, se puede hablar en términos generales de tres tipos de productos orgánicos destinados a la mejora del rendimiento de la planta y del suelo: enmiendas, fertilizantes y lodos de depuradora.

El producto utilizado en este trabajo no procede de la depuración de aguas residuales, sino que es el subproducto de un tratamiento de potabilización. Desde la perspectiva de la normativa medioambiental, los residuos procedentes de las estaciones de purificación de aguas únicamente se consideran residuos tóxicos o peligrosos cuando en su composición presentan alguno de los elementos enumerados en la tabla 4 del Reglamento de desarrollo de la Ley de Residuos Tóxicos y Peligrosos, y simultáneamente concurren en ellos algunas de las circunstancias que se enumeran en la tabla 5 de La misma disposición reglamentaria. Estas circunstancias no concurren, en principio, en el subproducto utilizado para la realización de este trabajo, por lo que según la legislación vigente no pueden ser calificados como residuos. En consecuencia, su comercialización y uso quedará condicionado a que reúna las características que permitan calificarlo, bien como fertilizante, bien como enmienda orgánica.

Son dos las razones en las que se sustenta la utilización de este subproducto como fertilizante férrico, su alto porcentaje de materia orgánica y la presencia de elevadas concentraciones de hierro. Según Linehan y Sepherd (1979), las formas insolubles de la materia orgánica pueden actuar como reservas de este micronutriente, pero solamente el Fe asociado a las formas solubles de la materia orgánica se encuentra de forma disponible para ser asimilado por la planta. Estas asociaciones deben ser suficientemente estables con el fin de permitir que el Fe se aproxime a las raíces de forma soluble, resultando por ello especialmente apropiadas a esta finalidad las estructuras de tipo quelato que puede producir la materia orgánica. La estructura de anillo característica de los quelatos incorpora el ion metálico en su interior y lo protege del ataque de agentes oxidantes y de precipitaciones.

El Aquamato férrico puede clasificarse como complejo de Fe que por su origen se

## VII Discusión

aproxima a los denominados complejos de Fe naturales, aunque presenta en su composición otros elementos, consecuencia de los tratamientos a los que ha sido sometido, por lo que no puede ser considerado exclusivamente un quelato de origen natural. La existencia de estos elementos influye necesariamente en su efecto sobre el suelo y la nutrición de la planta.

Debido a su presentación comercial, las características de solubilidad del Aquamato férrico limitan su uso en agricultura a la aplicación del fertilizante sólido al sustrato, excluyendo la aplicación foliar y la adición a las aguas de riego. Este condicionante resulta particularmente relevante para nuestro objetivo, dado que la fertirrigación es un sistema empleado en cultivos intensivos del sureste español, con gran trascendencia económica ya que permite un ahorro de agua y un mejor aprovechamiento de los fertilizantes. Lucena (1995) subrayó la importancia de la clorosis férrica en fertirrigación como consecuencia del uso de aguas y sustratos calizos, así como el escaso desarrollo de las raíces jóvenes que reduce la capacidad de la planta para tomar hierro. Por este motivo es necesario un aporte regular de Fe en forma soluble. Aunque el Aquamato férrico sea soluble en agua, tal y como se presenta en el mercado no puede competir como alternativa a los quelatos sintéticos en fertirrigación.

Para paliar este inconveniente se ha diseñado un concentrado líquido a partir de la extracción alcalina del Aquamato férrico. Los resultados de su aplicación sobre plantas de tomate cultivadas en hidroponía de sustrato, tanto en forma foliar como añadido a la disolución nutritiva, han demostrado la eficacia del extracto para corregir deficiencias de hierro a niveles similares a los reflejados por el Fe-EDDHA. Esto permitiría la utilización del Aquamato férrico en fertirrigación y aplicaciones foliares, siendo estas últimas consideradas, en ocasiones, más eficaces que la adición al suelo (Lucena, 1990).

Salvando estas consideraciones, la forma ordinaria de aplicación del Aquamato férrico será su adición al suelo mezclado con el sustrato. Por lo tanto, debe ser considerado el efecto de otros iones en el suelo, especialmente los micronutrientes. El Cu forma complejos muy estables con las sustancias húmicas y muy solubles, pero las cantidades de este elemento en el producto no son muy elevadas. Tampoco lo son los contenidos de Zn

y Mn. Si bien el primero forma complejos poco estables y no se retiene en suelos, es posible su adsorción en los óxidos de hierro, principalmente en la goethita (Parfitt y Rusell, 1977). Con relación a los complejos de Mn con las sustancias húmicas su estabilidad depende de las condiciones del medio, pero el Aquamato férrico presenta un contenido poco importante.

Los ensayos de interacción del Aquamato férrico con los diferentes materiales del suelo describen el comportamiento de los macronutrientes iónicos de forma acorde con sus mecanismos de adsorción y solubilización sobre estos materiales. Los numerosos grupos funcionales que presenta el Extracto húmico del Aquamato férrico, y que participan en los fenómenos de adsorción, explicarían en parte, este comportamiento.

Según Stevenson (1994), los ácidos húmicos y fúlvicos se adsorben en la montmorillonita cuando existen cationes polivalentes que participan en el intercambio iónico y mantiene neutralizados los grupos ácidos de la superficie de carga. Como consecuencia, en presencia de arcillas, se retienen todos los macro y micronutrientes a excepción de los monovalentes  $K^+$  y  $Na^+$ , y del  $Zn^{2+}$ . En concreto, este último se caracteriza por formar complejos menos estables. Otro factor a destacar es que los iones se encuentran fuertemente retenidos y son difícilmente desplazables. Tomando en cuenta estas consideraciones, se podría explicar el comportamiento observado por los macro y micronutrientes cuando el Aquamato férrico interacciona con una arcilla del tipo Montmorillonita cálcica. Habría que recordar que en este ensayo se producía una retención de todos los macro y micronutrientes iónicos, a excepción de los mencionados  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Zn^{2+}$ .

Por lo que hace referencia al  $Ca^{2+}$ , si bien se adsorbía inicialmente a las arcillas, se solubilizaba en presencia de un agente quelante fuerte a causa de la formación de complejos menos estables. La interacción de los compuestos orgánicos en la superficie de los óxidos de Fe implica mecanismos de reacción similares a los que han sido descritos para el caso de las arcillas, provocando la solubilización del  $Ca^{2+}$  y del  $Mg^{2+}$ . El  $Zn^{2+}$ , si bien es solubilizado, se adsorbe sobre el óxido, evitando así su disponibilidad (Parfitt y col., 1977). A excepción del  $Ca^{2+}$  y el  $Zn^{2+}$  soluble, el resto de los macro y micronutrientes no se solubilizan tras la interacción del Aquamato férrico con el carbonato cálcico. Los elevados pHs favorecen la

## VII. Discusión

formación de los complejos metálicos con la materia orgánica de carácter muy estable, tal como revelan los resultados de la posterior aplicación al residuo del extractante de Soltanpour y Schawb (1977).

Para finalizar, es preciso indicar que los ensayos de interacción del Aquamato férrico sobre un suelo agrícola, utilizado en el experimento vegetal en Valencia y un patrón de suelo, ambos con características propias de suelos calizos, no presentaron los mismos resultados. En el suelo de Valencia se apreció un efecto favorable a la solubilización de complejos insolubles y estables de los micronutrientes, a excepción del Zn, probablemente debido a los mecanismos anteriormente descritos en presencia de las arcillas. Mientras que en el patrón de suelo se favoreció la solubilización de los micronutrientes.

### **2. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO HÚMICO TOTAL DEL AQUAMATO FÉRRICO.**

La necesidad de caracterizar las sustancias húmicas con la finalidad de explicar sus efectos sobre la disponibilidad de los nutrientes y la movilidad de los contaminantes ha sido ampliamente destacada (Liehmann, Chen y Aviad, 1990; Chaney, 1994).

Los resultados expuestos en el capítulo IV, bajo el epígrafe "Caracterización de la fracción orgánica", reflejan que el Extracto húmico total del Aquamato férrico está formado por un fulvato férrico, que se presenta fuertemente oxidado como indica el elevado porcentaje de O. La relación C/H es igual a 1,67 valor que es considerado bajo según Steelink (1978) y que indicaría densidad de alto spin. Igualmente presenta baja relación  $E_4/E_6$ , lo que implica elevado grado de humificación y un contenido fenólico importante. La relación C/O está próxima a 1,43, generalmente apreciada como características de los ácidos fúlvicos procedentes de suelos, pero el Aquamato férrico tiene su origen en un sistema acuático. De cualquier forma, estos parámetros deben ser considerados con cautela, dado que el 18% del Extracto húmico total es Fe, por lo que más que un ácido, se trataría un sal tipo fulvato de Fe, con mayor o menor presencia de grupos hidroxilo completando la esfera de coordinación del Fe.

## VII Discusión

El espectro UV-visible del Extracto húmico total muestra un pico a 280 nm. Por lo general, las sustancias húmicas presentan como características el incremento de absorbancia cuando decrece la longitud de onda. De acuerdo con Chin y col. (1994), las transiciones electrónicas  $\Pi-\Pi^*$  corresponde a sustancias fenólicas, derivados de la anilina, ácidos benzoicos, polienos e hidrocarburos aromáticos policíclicos que son precursores o componentes de las sustancias húmicas, particularmente de aquellas que proceden de sistemas terrestres. Estos autores observaron que el coeficiente de extinción molar a 280 nm mostraba una buena correlación con el peso molecular y la aromaticidad de los ácidos fúlvicos, incluso mejor que la relación  $E_4/E_6$ . MacCarthy y Rice (1985) sugirieron que el pico a 280 nm era característico de los ácidos fúlvicos y era consecuencia de la superposición de bandas de los grupos cromóforos. Esto indica que el extracto húmico total presenta un elevado carácter aromático, y con sustituciones por grupos OH, y que podría ser compatible con un compuesto de naturaleza fúlvica. Esto último se corrobora con el estudio de caracterización efectuado en la mezcla de ácidos fúlvicos obtenida a partir del Aquamato férrico y que se utilizó para realizar el estudio de las características ácido base. El espectro FTIR obtenido de la mezcla purificada, presenta características comunes al del Extracto húmico total. Sin embargo se debe destacar la presencia de la banda a  $1720\text{ cm}^{-1}$ , indicativa de la existencia del grupo carbonilo, que no aparece en este segundo caso. Este hecho, así como el incremento de las relaciones O/C e H/C, refleja la presencia de grupos carbonilos libres, que no aparecen en presencia de cantidades elevadas de Fe como es el caso del Extracto húmico total. Por lo tanto se confirma que el Extracto húmico total es en su mayor parte un compuesto de naturaleza fúlvica donde los grupo carbonilo participan en el enlace metálico con el Fe.

Tanto los ácidos húmicos, como los fúlvicos actúan como polielectrolitos débiles en los cuales los grupos COOH controlados por el pH, afectan su habilidad para enlazar iones. El enlace puede influir en otras formas, tales como los cambios conformacionales de la molécula.

Se tiene constancia de que la macromolécula fúlvica presenta una fracción hidrofílica y una fracción hidrofóbica. La fracción hidrofóbica, muy heterogénea en puntos de reacción, es la que participa en la complejación de los metales (Sale y col., 1989). Los

## VII Discusión

ensayos de cromatografía de permeación sobre gel han mostrado que el extracto húmico total presenta dos fracciones, una aparece a mayor peso molecular, aproximadamente a 5000 Daltons, mientras que la segunda lo hace alrededor de 1000 Daltons. El Fe se asocia principalmente a la primera fracción, mientras que la segunda similar en características FUIR, es compatible con la sal del fulvato. El incremento del pH produce modificaciones principalmente en la fracción que lleva asociado al Fe y que presumiblemente se corresponde con la fracción hidrofóbica. Stevenson (1994) recoge las causas que pueden modificar la solubilidad de las sustancias húmicas en presencia de cationes polivalentes que se pueden resumir en tres puntos. En primer lugar, la precipitación del colide húmico como consecuencia de la protonación y la consiguiente reducción de carga del polímero, por ejemplo que la molécula sea más hidrofóbica. La segunda de ellas es la formación de complejos hidroxilados del ion metálico a pHs elevados, con la formación de óxidos hidratados o, como cuestión última, la formación de estructuras en cadena a través de puentes con los iones metálicos.

La solución del Extracto húmico en medio alcalino produjo la modificación de la estructura del coloide fúlvico, bien por la precipitación parcial del Fe asociado a esta fracción o como consecuencia de la reducción de carga del polímero. Los procesos de retención de la fracción hidrofóbica sobre la matriz del gel, conducen a pensar que se trata de un cambio conformacional producido por la precipitación del hidróxido de Fe, ya que aproximadamente el 30% del Fe contenido en el EHT se retiene en el precipitado. La liberación del metal se produce en las posiciones más lábiles, creando una diferencia de carga. Piccolo y col (1996) indicaron que las propiedades conformacionales de las sustancias húmicas en solución están gobernadas principalmente por las interacciones hidrofóbicas. Según estos autores, los ácidos fúlvicos pueden comportarse como pequeños y estables agregados micelares en los que existen suficientes grupos funcionales para mantener dispersas las micelas en solución.

El Fe se encuentra coordinado a los grupos carbonilo, y los ensayos de fraccionamiento del EHT por cromatografía de permeación sobre gel, indican la presencia de una fracción de Fe lábil, fácilmente modificado con la alcalinización y otro fuertemente retenido, asociado a compuestos con mayor carácter aromático. Este última fracción se



## VII Discusión

adsorbe a la matriz del gel a pH elevado y es movilizado con metanol. Otro punto que se debe destacar es el cambio de coloración producido en la fracción adsorbida por el gel. Inicialmente, era marrón y como consecuencia de la adición del metanol, viró a rosa. Este hecho podría indicar la presencia de Fe(II), por lo tanto la fracción fuertemente retenida presentaría posiciones ocupadas con este grado de oxidación.

### **3. EFECTO DEL AQUAMATO FÉRRICO SOBRE EL SUELO**

Aunque los aniones orgánicos son normalmente repelidos por las arcillas, por efecto de las cargas negativas de la superficie, la adsorción de los ácidos húmicos y fúlvicos por los minerales de las arcillas (es el caso de la montmorillonita) se produce cuando los cationes polivalentes están presentes en el mecanismo de intercambio de complejos. Los complejos que forma el Aquamato férrico con las arcillas son tan estables que la presencia de un agente quelante fuerte como el extractante utilizado en el método Soltanpour y Schawb (1979) no incrementa el Fe extraíble. Como consecuencia en suelos muy arcillosos el Fe no va a estar disponible para la planta, excluyendo otros posibles mecanismos de solubilización de Fe. Aunque esto no favorezca la disponibilidad del Fe, sí beneficia la formación de agregados estables que mejoran la calidad del suelo y que aunque no afectan directamente al crecimiento de la planta, mejoran las características físicas y químicas del suelo tales como la aireación, la penetración y retención de agua, la resistencia mecánica de las raíces y emergencia de los tallos. Sin embargo, para que estos efectos se produzcan serían necesario aplicar grandes cantidades de Aquamato férrico, que no serían rentables dado el precio del producto.

Tampoco se observó un aumento en la solubilización de Fe en presencia de hidróxidos de Fe. Posiblemente debido a los mecanismos de adsorción en los óxidos de Fe equivalentes a los producidos en las arcillas, aunque en esta ocasión son atribuibles a procesos de intercambio aniónico. La segunda observación fue el incremento de Fe extraíble tras la interacción del Aquamato férrico sobre los óxidos de Fe, aunque el aumento en el elemento extraíble suponga menos de 1% respecto del total adicionado con el fertilizante.

Además del papel del Aquamato férrico sobre la fertilización del Ca y Mg, ya

## VII Discusión

comentados en el Capítulo III, bajo el epígrafe “Caracterización de los productos”, deben tenerse en cuenta otros dos aspectos en los que estos iones inciden indirectamente. El primero está vinculado al proceso de tratamiento de las aguas y a la presencia de los óxidos de hierro en el Aquamato férrico. El segundo, está relacionado con la interacción de estos óxidos y las sustancias húmicas.

El efecto de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  sobre la precipitación de los hidróxidos férricos, durante los procesos de tratamiento de aguas, ha sido estudiado por Balpurvins y col., (1997). La concentración inicial de estos iones y el pH afectan directamente a la formación y transformación de los óxidos de Fe(III) originados al final del proceso, influyendo en la posterior solubilización de los mismos. En presencias de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ , la ferrihidrita ha sido encontrada como la fase cinéticamente preferente. En ausencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , la ferrihidrita se transforma en hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) y goethita. Por el contrario, cuando se incrementa la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  se promueve la formación de la hematita a expensas de la goethita, al tiempo que se reduce la velocidad de transformación.

En general, la adsorción sobre estos óxidos de Fe de las sustancias húmicas decrece cuando se incrementa el pH. Según Tipping (1978) la interacción se produce mediante un mecanismo de intercambio de ligando de los grupos aniónico con  $\text{H}_2\text{O}$  y el  $\text{OH}^-$  de la superficie de  $\text{Fe-OH}_2^+$  y  $\text{Fe-OH}$  respectivamente, con un incremento del grado de protonación de las sustancias húmicas adsorbidas. En presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  la capacidad de adsorción aumenta por la coadsorción de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Los procesos de adsorción y desorción de los óxidos de hierro sobre la superficie de las sustancias húmicas deben ser considerados, porque la floculación y coagulación así como la velocidad de sedimentación y las interacciones con otras sustancias, afectan a la disponibilidad de este elemento.

### **4. EFECTO DEL AQUAMATO FÉRRICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA PLANTA.**

Con relación a los efectos de las sustancias húmicas sobre la germinación y el desarrollo de plántulas, se sostiene que existe una fuerte respuesta a la sustancias húmicas

## VII Discusión

a partir del estado de crecimiento. Efecto que se hace igualmente patente sobre el rendimiento final de la planta.

El efecto del Aquamato férrico sobre la germinación ha sido comprobado en plántulas de tomate y pimiento, que tiene carácter positivo en un intervalo beneficioso, pero que a dosis elevadas puede inhibir la germinación. La naturaleza de las sustancias húmicas influye en la estimulación, siendo favorecida indistintamente tanto por los ácidos húmicos como por los ácidos fúlvicos (Smidova, 1962; Dixit, 1967), aunque parece que la planta permite una mayor concentración de estos últimos.

Los autores han descrito la influencia estimulante de las sustancias húmicas en la iniciación de la raíz y en el crecimiento del tallo, favoreciéndose también la proliferación de raíces secundarias, si bien es cierto que la mayoría de los ensayos encontrados en la bibliografía en relación con el desarrollo radicular, han sido desarrollados en soluciones nutritivas (Sladky, 1959; Sánchez Conde y Ortega, 1968; Sánchez-Conde y col. 1972; Fernández, 1968; Alexandrova, 1977). Tanto la estimulación del tallo como de la raíz se ve favorecida en plantas de pimiento y tomate, cuando el Aquamato férrico ha sido utilizado en mezclas con el sustrato. Cuando las sustancias húmicas se añaden en pequeñas cantidades, el efecto se concentra en los estados iniciales del tratamiento, apreciándose un incremento en la longitud de tallo y peso seco. Por su parte, las dosis elevadas ejercen una acción a más largo plazo, estimulando tanto el desarrollo radicular como el de la parte aérea, pero retardando la germinación, que pueden llegar a inhibir en casos extremos.

Este mismo efecto sobre la elongación de la raíz y del tallo fue observado en la evaluación del fertilizante líquido sobre tomate cultivado e hidroponía de sustrato, y tanto en las aplicaciones foliares como en las realizadas sobre disolución nutritiva. Aunque en un principio no se manifestaron diferencias en el crecimiento de la raíz, estas aumentaron con el transcurso de los tratamientos, mientras que inicialmente se producía incremento en la parte aérea.

Otro efecto sobre el crecimiento que ha sido observado en este estudio es el incremento producido en los brotes y hojas nuevas de plantones de cítricos, cuando son

## VII Discusión

cultivados en invernadero de investigación y condiciones controladas. El incremento de brotes, consecuencia de los tratamientos con Aquamato férrico, no es atribuible exclusivamente a la mejora en la nutrición mineral, ya que fueron las aplicaciones con quelatos sintéticos la que más la favorecieron. Sin embargo, sí pueden explicar el aumento del número de hojas pues no se reflejaron diferencias significativas entre los dos tratamientos.

La incidencia de la germinación y los efectos iniciales de estimulación del tallo también podrían ser explicados sobre la base de la existencia de sustancias promotoras del crecimiento asociadas a la fracción fúlvica. Éstas pueden afectar al crecimiento de la planta en bajas concentraciones y entre ellos destacan las fitoquelatinas. De acuerdo con Flaig (1965) la acción de los compuestos fisiológicamente activos depende de las condiciones medioambientales: luz, temperatura, agua, presión del oxígeno y de la disponibilidad de los nutrientes. Una de las teorías apuntadas es que estas sustancias son las responsables del efecto sobre el incremento de la producción, cuando las condiciones son muy propicias para el crecimiento de la planta (Stevenson, 1994). Piccolo col., (1992) demostraron que la fracción más efectiva para promover la actividad hormonal en el desarrollo de plantas de berro y lechuga presentaba el menor tamaño molecular y el mayor contenido en grupos funcionales ácidos, mientras que los contenidos alifáticos y aromáticos no parecían ejercer ninguna influencia.

Dentro de los constituyentes de las sustancias húmicas, deben ser considerados los compuestos de naturaleza lipídica, tales como los ácidos orgánicos y esteroides de bajo peso molecular, que están presentes en pequeñas cantidades, pero son fisiológicamente muy activos. Su principal propiedad es que son solubles en varios disolventes orgánicos, principalmente en metanol y etanol (Rice y MacCarthy, 1982). Su interés estriba en el hecho de que algunos de estos compuestos puede inhibir el crecimiento de la planta, mientras que otros pueden actuar como hormonas de crecimiento. La acumulación de lípidos ha sido considerada una de las principales causas de la fatiga del suelo (Stevenson, 1994) y entre las sustancias que presenta carácter fitotóxico se citan los ácidos fenólicos y ácidos orgánicos (Moje, 1966). Estos compuestos generalmente se encuentran en bajas concentraciones en los suelos agrícolas normales. Los procesos de descomposición de

## **VII Discusión**

residuos orgánicos o su excreción por las raíces de las plantas pueden incrementar sus niveles, favoreciéndose su acumulación y ejerciéndose el efecto fitotóxico descrito. La utilización de mezclas con alto contenido en Aquamato férrico podría favorecer la acumulación de estos compuestos, dado el carácter ligeramente ácido de la mezcla y la presencia de compuestos lipídicos en el Aquamato férrico, lo que podría dar lugar a la inhibición de la germinación.

Los compuestos lipídicos pueden presentarse asociados al resto de los constituyentes orgánicos que forman el extracto húmico total, por lo que pueden resultar insolubles a los disolventes usuales, pero pueden ser aislados mediante cromatografía de adsorción y posterior elución con metanol. La presencia de asociaciones de Fe con compuestos de naturaleza lipídica en el Extracto húmico total podría explicar la estimulación observada en la germinación y en el crecimiento del tallo a corto plazo, dado que se corresponde más a un efecto hormonal que a un efecto sobre la nutrición mineral.

### **5. EFECTO DEL AQUAMATO FÉRRICO SOBRE LA NUTRICIÓN MINERAL**

El Aquamato férrico es también susceptible de ser utilizado como corrector de micronutrientes, y si bien sus contenidos en origen de Ca y Mg no son muy elevados, sí están fácilmente disponibles, por lo que es posible sostener que afectarán directamente a la nutrición de la planta. Un comportamiento análogo ha sido descrito para los micronutrientes, especialmente en el caso del Zn, por lo que también cabe atribuir al Aquamato férrico este efecto beneficioso sobre los micronutrientes de la planta.

El aumento en el crecimiento de la planta tratadas con sustancias húmicas ha sido asociado comúnmente a la mejora en la absorción de macronutrientes, aunque parece que los resultados no indican que la acumulación de nutrientes en planta se correlacione con su contenido en las sustancias húmicas (Davis y col., 1994). No se encuentra en la bibliografía un criterio unánime a excepción del supuesto de aquellos cationes que pueden formar complejos con las sustancias húmicas como el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . La absorción de estos iones estará influida tanto por las características del suelo y la naturaleza de las sustancias húmicas adicionadas, como por las del sistema radicular de la planta (Gaur, 1964; Sánchez-

## VII Discusión

Conde y Ortega, 1968; Dormaar, 1975; Davis, 1994). Otro elemento que se puede ver afectado es el P, debido a la acción de solubilización de los fosfatos, e incluso el nitrógeno que también participa en la composición de las sustancias húmicas (Stevenson y He, 1990). Ayuso y col. (1996) mostraron que la aplicación de sustancias húmicas favorecía la absorción de nutrientes (N, P, K). En bajas dosis estas sustancias estimulaban la absorción de N, mientras que en dosis elevadas la aminoraban. El P manifestaba, sin embargo, la tendencia opuesta.

Dada la naturaleza el Aquamato férrico y del Doliron, su acción se ejercerá principalmente sobre la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . No obstante las características químicas del sustrato pueden afectar a la disponibilidad de cualquiera de los macronutrientes como ya se ha indicado en el estudio de interacción con los materiales del suelo.

Los ensayos vegetales efectuados en *Citrus* y *Prunus persica* han confirmado el efecto favorable del Aquamato férrico y del Doliron, respecto de la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , incluso en presencia de contenidos foliares de  $\text{K}^+$  elevados. A efectos de utilizar el Aquamato férrico como corrector de deficiencias, mezclado con sustratos orgánicos en cultivos extensivos, es interesante el empleo de bajas proporciones de éste producto en la mezcla. Los ensayos sobre *Capsicum annuum* y *Lycopersicon esculentum* Mill revelan la retención de  $\text{Ca}^{2+}$  en el sustrato, debido a la formación de complejos estables, aminorando su disponibilidad para la planta. Esto no afecta al  $\text{Mg}^{2+}$ , cuya asimilación se ve contrariamente favorecida. La influencia del Aquamato férrico y del Doliron sobre la nutrición del  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  tiene más relación con los procesos de solubilización de los óxidos de hierro presentes en los mismos, que con el efecto de las sustancias húmicas sobre la absorción de macronutrientes descritos por Chen y Aviad (1990). Como se ha mencionado anteriormente, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  son coadsorbidos con los óxidos de hierro en el proceso de potabilización del agua (Balpurvins y col., 1997), y pueden ser liberados a pHs elevados, caso de los suelos de Valencia y Lleida, cuando la adsorción de los óxidos de Fe sobre las sustancias húmicas decrece (Tipping, 1978). De esta forma quedarían disponibles para ser utilizados por la planta.

La presencia de cantidades elevadas de  $\text{Fe}^{3+}$  en el Aquamato férrico facilita así la

formación de fosfatos férricos insolubles. Como consecuencia, el aumento de la proporción de Aquamato férrico en la mezcla de sustrato, en las condiciones descritas en los ensayos de Almería, no propicia la asimilación de P por la planta, tal como se ha demostrado en los cultivos sobre *Capsicum annuum*, *Licopersicon esculentum* Mill y *Cucumis sativus*.

Una de las utilizaciones más generalizada de las sustancias húmicas es su aplicación como correctores de micronutrientes, aprovechando su capacidad quelante. A excepción del Fe, al que aludiremos en el punto siguiente, el Aquamato férrico y el Doliron han mostrado su eficacia para mejorar los niveles de  $Zn^{2+}$  en todos los experimentos realizados. Asimismo, los contenidos en Cu y Mn variaron según las condiciones de cultivo, aunque en ningún caso llegaron a alcanzar niveles tóxicos.

La carencia de Zn suele manifestarse en suelos calizos donde este metal se halla insoluble (no asimilable) y en suelos ácidos donde el Zn, entonces, muy móvil es lavado en profundidad. Esta deficiencia, al igual que ocurre con la clorosis férrica, es muy frecuente en *Citrus* y *Prunus persica* cultivados en zonas de importancia agrícola tales como el sureste y nordeste español, donde se encuentran localizadas las provincias de Valencia y Lleida y produce efectos sobre los cultivos similares a los descritos para la deficiencia de hierro. Por lo tanto este efecto es muy valorable y beneficioso.

El incremento observado sobre peso seco de la hoja y sobre la producción en las aplicaciones de Fe-EDDHA sobre melocotonero, puede ser atribuido a la mejora del estado férrico aunque, de acuerdo con Casero (1985), los niveles de  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  deben ser considerados en la mejora de la nutrición de *Prunus persica* vr. Sudanell.

### **6. EFECTO SOBRE LA NUTRICIÓN FÉRRICA**

El hierro ha sido el micronutriente más estudiado en los trabajos dedicados a la eficacia de las sustancias húmicas como correctores de micronutrientes. Estos se remontan a 1932, cuando Burk y col, demostraron la capacidad de las sustancias húmicas para aportar Fe a plantas cultivadas en solución nutritiva con contenidos elevados de fósforo y pH alcalino. Desde entonces, los estudios se han concentrado en convertir estas sustancias en

## VII Discusión

alternativa a los quelatos sintéticos más eficaces, pero también más caros.

El inconveniente que se ha encontrado en la utilización de las sustancias húmicas como correctores de las deficiencias de Fe, ha sido la baja estabilidad de los complejos ferro- húmicos que dificulta la asimilación de Fe por la planta (Lucena, 1990), a través de los mecanismos normales de solubilización y absorción de micronutrientes, desde los complejos a la superficie de las raíces (Marschner y col, 1985). La solubilidad de las fracciones de la materia orgánica es un factor importante para determinar si se potencia o se inhibe la asimilación de Fe. Claramente, las bajas concentraciones de compuestos solubles de la sustancias húmicas con Fe, Cu, Zn y Mn podrían estimular la absorción por las plantas, y de esta forma mejorar el estado nutricional de éstas (Rauthan y Schnitzer, 1981). La mayor parte de la materia orgánica en suelo se presenta en formas insolubles, mientras que sólo pequeñas cantidades se encuentran en disolución. Las formas insolubles pueden actuar como reservas de Fe, pero solamente los micronutrientes asociados a la materia orgánica soluble estarán disponibles para ser utilizadas por la planta (Linehan y Shepherd, 1979).

Los resultados de la aplicación de Aquamato férrico en suelos calizos, con el fin de suministrar Fe a cultivos de *Citrus* y *Prunus persica*, han mostrado la capacidad de incrementar los contenidos foliares de este micronutriente a niveles próximos a los de los quelatos sintéticos, pero en ningún caso los han superado. La influencia de estos tratamientos sobre las relaciones entre nutrientes, que caracterizan la nutrición férrica manifiestan, sin embargo que tratamientos tales como las dosis dobles de Doliron han beneficiado el estado férrico de *Citrus* cultivados en las condiciones experimentales de Bétera (Valencia), aún con contenidos toales de Fe foliar bajos. En esta ocasión, la medida del índice SPAD mostraba resultados próximos a los obtenidos para las aplicaciones de los quelatos sintéticos, lo que induce a pensar que se trata de Fe fisiológicamente activo. Las aplicaciones más eficaces sobre melocotón fueron aquellas donde participaban los quelatos sintéticos, aunque se consiguieron resultados próximos con los tratamientos de las dosis normales de Aquamato férrico.

Estos resultados si bien confirman la capacidad del Aquamato férrico del Doliron para suministrar Fe a la planta en las condiciones de cultivo, no muestran su eficacia para



## VII Discusión

corregir la clorosis férrica. Esto es esencialmente notorio en el cultivo de melocotón, donde todos los árboles mostraron síntomas de clorosis a excepción de aquellos tratados con el quelato sintético. Las dosis dobles de los humatos reflejaron niveles de Fe similares los de los controles y, si bien las dosis normales incrementaron el contenido foliar de este bioelemento, no fue suficiente para suplir los requerimientos de la planta. En el caso del Dóliron, la asimilación del metal se produjo de forma tan lenta que no era suficiente para paliar el problema.

La obtención de concentrados líquidos basados en los complejos organometálicos asimilables, derivados de los ácidos fúlvicos y húmicos, parece ser una alternativa más eficaz a la aplicación de complejos metalo-fúlvicos al suelo (Alexander, 1988; García-Mina, 1994). Según Alexander (1988) cualquier método que utilice una sal alcalina de un humato metálico en combinación con aditivos, para incrementar el efecto sinérgico de los humatos, podría producir humatos líquidos útiles en agricultura. Si la sal alcalina fuera la de un fulvato férrico, soluble en medios alcalinos, podría ser capaz de corregir la clorosis férrica. Los estudios de FTIR han mostrado que el Fe asociado a la materia orgánica lo está a compuestos de tipo fúlvico, estables en solución alcalina que adecuadamente estabilizados, podrían ser utilizados como concentrados húmicos. Entre las ventajas de estos concentrados líquidos se encuentra su posible aplicación en fertirrigación y vía foliar.

La aplicación foliar del concentrado obtenido a partir de la estabilización de la sal alcalina con ácido cítrico, resultó eficaz para corregir estados severos de deficiencia férrica en plantas de tomate cultivadas en sustrato inerte. Las plantas de tomate respondieron de forma rápida a la aplicaciones vía foliar, manteniéndose los niveles de Fe total en planta en concentraciones similares a las mostradas por el quelato sintético. La traslocación de este elemento de la parte aérea a la raíz revela su asimilación por parte de la planta, planteándose como una alternativa más eficaz que la aplicación directa al suelo de los productos sólidos.

Los ensayos vegetales realizados en invernaderos comerciales en Almería, mostraron la incidencia de la proporción de Aquamato férrico en una mezcla de sustratos. Los resultados de contenido de Fe en plantas de pimiento y tomate, muestran que a medida que aumenta la proporción de Aquamato férrico en la mezcla, la cantidad de Fe en raíz

## VII Discusión

---

disminuye, pero aumenta la de tallo y hoja. Mientras, en plantas de pimiento disminuía el contenido de Fe foliar a medida que se incrementaba la proporción de Aquamato férrico en la mezcla.

El incremento de Aquamato férrico en la mezcla implica un aumento en la cantidad de Fe, tanto quelado como de ligando libre. Cuando las concentraciones de Aquamato férrico son pequeñas, en principio, el incremento de la concentración de ligando produce incrementos en la concentración de Fe quelado capaz de disociarse rápidamente para remplazar el Fe absorbido por la planta. La absorción sería máxima a la concentración de ligando resultante en la complejación de todo el Fe presente o todas las posiciones lábiles. Cuando existe mucho Aquamato férrico libre, también lo hace la cantidad de agente quelante, y como consecuencia aumenta el número de grupos carboxílicos libre que evitarían la absorción del Fe.

### **7. MODELO DE ACTUACIÓN DEL AQUAMATO FÉRRICO SOBRE LA NUTRICIÓN MINERAL.**

De lo apuntado anteriormente en relación con el efecto del Aquamato férrico sobre la nutrición mineral de la planta, cabe deducir y formular un modo de actuación de este producto. Uno de los factores que más se debe controlar en sus aplicaciones en suelo es la presencia de altos contenidos de P, elemento éste habitual en suelos españoles. Los óxidos de hierro que participan en la composición del Aquamato férrico facilitan la solubilización de los fosfatos férricos y, como consecuencia, se produce la liberación del Zn. Este elemento inicialmente se encontraba absorbido en la superficie del óxido y queda así disponible para ser asimilado por la planta. Si bien la deficiencia del Zn puede ocasionar problemas fisiológicos, no es menos cierto que, en estas condiciones, pueden llegar a alcanzarse niveles de toxicidad.

Ahora bien, cuando las concentraciones de P son bajas o los pHs son elevados, se produce la precipitación del fosfato. Al tiempo, el Ca y el Mg, que se encuentran coabsorbidos en el óxido de Fe, pueden ser liberados y, del mismo modo, este efecto se producirá en el Zn.

## VII Discusión

---

En consecuencia, es posible afirmar, a la vista de los resultados obtenidos, que los efectos del Aquamato férrico y del Doliron respecto de la nutrición mineral no cabe atribuirlo exclusivamente a la influencia de las sustancias húmicas sobre la absorción de nutrientes, sino también, y no en menor medida, con los procesos de solubilización de los óxidos de hierro que aquéllos contienen aquéllos.

## **VIII. CONCLUSIONES**

## VIII Conclusiones

De lo expuesto en la presente Memoria, tras la realización de los ensayos descritos y con base en la discusión contenida en el capítulo anterior, cabe deducir las siguientes conclusiones:

1. La eficacia del Aquamato férrico como fertilizante de hierro se debe principalmente, en el caso de los materiales edáficos ensayados en esta memoria, a la interacción de este producto con los óxidos férricos. Tanto las arcillas como el carbonato cálcico limitan la capacidad del Aquamato férrico para incrementar los niveles de Fe soluble y disponible. Si bien dicha capacidad es anulada siempre que existan óxidos de hierro en el suelo.

Independiente de la naturaleza del material, en todos los casos se aprecia un efecto favorable a la formación de especies solubles de Zn, salvo cuando la presencia en el suelo de elevados contenidos de óxidos férricos favorece la adsorción de este catión en su superficie.

2. Respecto de la capacidad del Doliron como fertilizante férrico, también cabe atribuirle a la interacción de éste producto con los óxidos férricos. Ahora bien, en este caso, los elevados contenidos de arcillas, tipo Montmorillonita, disminuyen la formación de especies solubles, circunstancia ésta que no se aprecia en presencia de Carbonato cálcico. Sin embargo, la existencia de estos dos materiales no disminuye la fracción de metal disponible.

Además del efecto sobre el Zn se revela la efectividad de este producto para incrementar las especies solubles y disponibles de Mg. Este hecho es debido a los elevados contenidos nativos de este elemento consecuencia de la modificación de Doliron con Dolomita.

3. La caracterización del Extracto húmico total del Aquamato férrico indica que se trata de un fulvato férrico, con el ion Fe ocupando diferentes entornos y como consecuencia diferente grado de interacción con la materia orgánica. Los espectros de FTIR confirmaron que el grupo carbonilo participa en el enlace del metal,

## VIII Conclusiones

mientras que los ensayos de permeación sobre gel mostraron que el metal se asocia a la fracción hidrofóbica de estos ácidos. Como consecuencia de las modificaciones del pH se libera el metal asociado a las posiciones más lábiles, pero se mantiene el Fe más fuertemente retenido. Esta última fracción aislable en medio básico y metanol - lo que confirma su naturaleza- podría actuar como promotora del crecimiento. Los estudios ácido base de la mezcla de ácidos fúlvicos obtenidos a partir del Aquamato férrico revelaron una mayor densidad de grupos funcionales ácidos carbonilos, respecto a los fenólicos. Por último, los ensayos de especiación indican la existencia de Fe(II) en el extracto húmico total, aunque la mayor parte de este metal se presenta como Fe(III).

Todas estas características indican que el Aquamato férrico, además de poder ser utilizado como quelato natural de Fe, presenta una fracción orgánica muy activa desde el punto de vista fisiológico de la planta.

4. Se observa un efecto del Aquamato férrico sobre la germinación y el peso seco de la hoja, no atribuible exclusivamente a la nutrición, que cabe entender causado por el efecto estimulador de la fracción de menor peso molecular. Este efecto es propiciado por las dosis bajas y se concentra en la estimulación de la longitud del tallo y del peso seco. Puede ser atribuida a las sustancias de naturaleza lipídica, consideradas promotoras del crecimiento, y que en elevadas cantidades ejercen un efecto fitotóxico. Además, existe un segundo efecto, observado a medida que transcurre el tratamiento, se proyecta principalmente sobre el desarrollo radicular y, también, en un incremento del desarrollo de la parte aérea. El desarrollo radicular beneficia la asimilación de macronutrientes de naturaleza catiónica, especialmente  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , y que permite un mejor balance nutricional.
6. A excepción de plantas de pepino cultivadas en invernadero comercial sobre sustrato orgánico, el Aquamato férrico ha mejorado la asimilación de Zn en el resto de los materiales vegetales ensayados.
7. En condiciones de extrema insuficiencia de Fe estos quelatos naturales no dan lugar

### VIII. Conclusiones

---

a incrementos del nivel de Fe equivalentes a los que son consecuencia de la aplicación de los quelatos sintéticos, aunque si dan origen a producciones iguales e incluso superiores a las que se obtienen mediante la aplicación de aquéllos, como consecuencia de la mejora ocasionada en el balance nutricional. Resulta, por tanto, posible su utilización en tales condiciones como alternativa a los quelatos sintéticos.

8. Desde el punto de vista de su eficacia como fertilizante férrico, la utilización de un extracto acuoso, adecuadamente estabilizado y aplicado preferentemente vía foliar, se perfila como alternativa clara a la utilización de quelatos sintéticos.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**



## IX Bibliografía

- Abadía A.; Poc A. y J. Abadía. 1991. Could iron nutrition status be evaluated through photosynthetic pigment changes?. *J. Plant Nutr.* 14:987-999
- Abadía, J.; Nishio, J; Monge E. Montañés, L. y L. Heras. 1986. Mineral composition of peach leaves affected by iron chlorosis. *J. Plant Nutr* 8:697-707.
- Abadía A.; Sanz M.; de las Rivas, J. y J. Abadía. 1989. Photosynthetic pigments and mineral composition of Fe deficiency pear leaves. *J. Plant Nutr.* 12:827-838.
- Aiken, G.R. 1985a. Isolation and concentration techniques for aquatic humic substances *En* Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization. G.R. Aiken et al (ed.) pp. 363-385. Wiley-Interscience, New York
- Aiken, G.R. 1985b. A critical evaluation of the use of macroporous resins for the isolation of aquatic humic substances *En* Humic substances their role in the environment. F.H. Frimmel y R.F. Christmans. (eds). Wiley-Interscience, New York
- Aiken, G.R.; D.M. McKnight; R.L. Wershaw and P. MacCarthy. 1985. An introduction to humic substances in soil, sediment and water. *En* Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization. G.R. Aiken et al (ed.) pp. 1-9. Wiley-Interscience, New York
- Álvarez-Fernandez, A.; Gárate, A.; Juárez, M. y J.J. Lucena. 1996. Tomato acquisition of iron from iron chelates in a calcareous sandy substrate. *J. Plant Nutr.* 19:8/9 pp 1279-1293.
- Alcántara, E. y de la Guardia, M.A. 1987. Differential response of sunflower genotypes to iron deficiencies. *En* Genetic aspects of plant nutrition. pp. 475-462. Gabelman, W.H y Loughman B.C. (Eds). Martinus Nihoff. Publ. Dordrecht.
- Alexandrova, I.V. 1977. Soil organic matter and the nitrogen nutrition of plants. *Sov. Soil Sci.* 9:293-301.
- Amacher, M.C.; Kotuby-Amacher, J.; Selim H. y M. Iskandar, I.K. *Geoderma* 1986. 38, 131-154
- Angle S.J. 1994. Sewage sludge: pathogenic considerations *En*: Sewage Sludge: land utilization and the environment. pp 35-39. (Ed) C.E. Clapp y col. SSSA Miscellaneous Publication ASA-CSSA-SSSA. Madison.
- Ahrens, E. y G. Farkasdi. 1969. Investigations on nitrogen mineralization in soil after application of town refuse of different degrees of decomposition. *Spderh. Landw. Forsch.* 23:77-78.
- Arribas, S.; Álvarez. M.L. y M.A. Aberturas. 1975. *Química Analítica XXIX*, pp. 163. Ed.

## IX Bibliografía

Paraninfo. Madrid.

- Ayuso, M.; Hernandez, T.; Garcia, C. y J.A. Pascual. 1996. Stimulation of barley growth and nutrient absorption by humic substances originating from various organic materials. *Bioresour-technol.* 57 (3): 251-257.
- Bar-Ness; E., y Y.Chen. 1990a. Manure and peat based iron-organo complexes: I Characterization and enrichment *En* Iron nutrition and interactions in plants. (ed). Y. Chen y Y. Hadar. Martinus Nijhof. Dorcrecht, The Netherlands. pp
- Bar-Ness; E., y Y.Chen. 1990b. Manure and peat based iron-organo complexes: II transpor in soils *En* Iron nutrition and interactions in plants. (ed). Y. Chen y Y. Hadar. Martinus Nijhof. Dorcrecht, The Netherlands. pp
- Bailey, L.H. 1977. Manual of cultivated plants. McMillan Publishing Co. Inc. (16ª ed) New York.
- Baltpurvins K; R.C Burns ; G.A Lawrence; y A.D. Stuart. 1997. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and type of aging of iron (III) hydroxide precipitates. *Environ. Sci. Technol.* 31: 1024-1032
- Barak, P y Y. Chen. 1982. The evaluation of iron deficiency using a bioassay-type test. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46:1019-1022.
- Barceló Coll, J.; Nicolás Rodrigo, G.; Sabater García B. y R. Sánchez Tamés. 1988. Fisiología vegetal. Quinta edición. Ediciones Pirámide. Madrid.
- Bell, P.F.; R.L. Chaney y S.J. Angle. 1988. Ferric activity in chelator buffered nutrient solutions necessary to provide adequate Fe for barley. *Agronomy Abstracts.* p 229. American Society of america, Madison, WI.
- Bienfait, H.F. 1985. Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. *J. Bioenerg. Biomembr.* 17:73-83.
- Bloom, P.R. 1981. Metal organic matter interactions in soils. *En* Chemistry of the soil environment pp 129-150. (Ed) R.H. Dowdy y col. Publicación especial nº40. American Society of Agronomy, Madison.
- Bloom, P.R. y J.A., Leenheer, 1989. Vibrational, electronic, and high-energy spectroscopic methods for characterizing humic substances. *En: Humic Substances II. In search of sructure.* pp 409-446. (Ed) M.H. B. Hayes, P. Mac Carthy, R.L. Malcolm, y R.S. Swift. John Wiley & Sons Ltd.
- Bloom, P.R. y M.B. McBride. 1979. Metal ion binding and exchange with hydrogen ions in acid-washed peat. *Soil Sci. Soc. Am. J.* (43):687-692.

## IX Bibliografía

- Borggaard O.K. 1974. Experimental conditions concerning potentiometric titration of humic acid. J. Soil Sci. 25:189
- Boyd, S.A.; L.E. Sommers y D.W. Nelson. 1981. Copper (II) and Iron (III) complexation by the carboxylate group of humic acid. Soil Sci. Soc. Am. J., 45:1241-1242.
- Boyd, S.A.; L.E. Sommers y D.W. Nelson. 1980. Changes in the humic acid fraction of soil resulting from sludge application. Soil Sci. Soc. Am. J., 44:1179-1186.
- Boyd, S.A. y L.E. Sommers, 1990. Humic and Fulvic acids from sludges. *En* Humic substances in Soil and Crop Sciences: Selected readings. pp 203-220. (Ed) P. MacCarthy, C.E. Clapp, R.L. Malcolm, y P.R. Bloom. American Society of Agronomy, Madison.
- Brenner, J.M. 1950. Soil Sci., 1:198.
- Bronsted, J.N. (1931) Molecular magnitude and phase distribution. Z. Phys. Chem., Bodenstern-Festband 257-266.
- Brook, A.J.W. y S. Housley. 1969. The interaction of phenols with Sephadex gels. J. Chromatogr. 41:200-204.
- Brown J.C. y V.D. Jolley. 1989. Plant metabolic responses to iron-deficiency stress. BioScience 39:546-551.
- Brüggemann, W.; Moog, P.R.; Nakagawa, H.; Janiesch, P. y P.J.C., Kuiper. 1990. Plasma membrane-bound Fe<sup>3+</sup>-EDTA reductase and iron deficiency in tomato *Lycopersicon esculentum*. Is there a Turbo reductase?. Physiol. Plant. 79, 339-346.
- Bruinsma, J. 1963. The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. Photochem. Photobiol., 2, 241-249
- Burge, W.E.; Millner, P.D.; Enkiri, N.K. y D. Hussong. 1987. Regrowth of salmonellae in composted sewage. USEPA 600/2-86/106. (NTIS PB 87-129532/AS). Springfield, VA.
- Buckhout, T.J. y D.G. Luster. 1991. Pyridine nucleotide-dependent ferricyanide reduction associated with isolated plasma membranes of maize (*Zea mays* L.) roots. Protoplasma 135:144-154.
- Buckhout, T.J.; Bell, P.F.; Luster, D.G. y R.L. Chaney. 1989 Iron-stress induced redox activity in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is localized on the plasma membrane. Plant Physiol 90:151-156.
- Cadahía, C. 1973. Determinación simultánea de N y P en suelos con un sistema

## IX Bibliografía

- autoanalizador. Anal. Edafol. Agrobiol. 32:479-500.
- Cambra, M. 1979. Estudio de variedades españolas de melocotonero de carne amarilla dura I.T.E.A. nº 37, pp 18-26
- Carpena, O.; Ortuño, A. y S., Llorente. 1965. Nuevas orientaciones en los tratamientos curativos de la deficiencia de Fe. Anal. edafol. Agrobiol. XXIV:3-4.
- Carpena, O.; Llorente S.; León, A. y A. Torrecillas. 1976. Análisis de fracciones de bioelementos como instrumento de diagnóstico de la nutrición mineral. Proc. IV Int. Coll. Cont. Plant Nutr. Vol I, 1-9.
- Casero, T. 1985. Estudio de la evolución, relaciones y balances nutrientes en melocotonero Sudanell. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Celis, R.; Cox, L.; Hermosín, M.C. y J. Comejo. 1997. Sorption of thiazafluron by iron- and humic acid-coated montmorillonite. J-environ-qual. 26 (2): 472-479.
- Cole, D.W.; Henry, C.L. y W. Mutter. 1986. The forest alternative for treatment and utilization of municipal and industrial wastewater and sludge. Univ. Of Washington Press, Seattle.
- Chapman, H.D. 1960. Leaf and Soil analysis in Citrus orchards. Calif. Agr. Exp. Sta. Service Manula 25. Univ. California
- Chaney, R.L. 1994. Trace metal movement: soil-plant systems and bioavailability of biosolids-applied metals. pp 27-31 *En*: Sewage Sludge: land utilization and the environment. (Ed) C.E. Clapp, W.E. Larson y R.H Dowdy. SSSA Miscellaneous Publication ASA-CSSA-SSSA, 677 South Segoe Road, Madison WI 53711, USA.
- Chaney, R.L. y P.F. Bell. 1987. Complexity of iron nutrition: Lessons for plant-soil interaction research. J. Plant Nut. 10:963-994.
- Chaney R.L.; Brown J.D. y L.O. Tiffin. 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. Plant Physiol. 50:208-213.
- Chaney, R.L.; Green, C.E.; Filcheva, E. y S.L. Brown, 1994. Effect of Iron, Manganese and Zn enriched Biosolids compost on uptake of Cadmium of Cadmium by Lattuce from Cadmium-contaminated soils. pp 205-207 *En*: Sewage Sludge: land utilization and the environment. (Ed) C.E. Clapp, W.E. Larson y R.H Dowdy. SSSA Miscellaneous Publication ASA-CSSA-SSSA, 677
- Chaney R.L. y Ryan J.A. 1993. Heavy metals and toxic organic pollutants in MSW-compost: Research results on phytoavailabiliy and bioavailability. p. 451-506. *En* Science and engineering of composting Design, environmental, microbiological and

## IX Bibliografía

- utilization aspects (ed) H.A.J. Hoitink and H.M. Keener. Ohio State Univ., Columbus
- Chaney, R.L.; Ryan, J.A. y G.A., O'Connor. 1991. Risk assessment for organic micropollutants: U.S. point of view. pp 141-158. *En* Treatment and use of sewage sludge and liquid agricultural wastes. (Ed) P. L'Hermite. Elsevier Applied Science, New York.
- Chen, Y.; Senesi N. y M. Schnitzer. 1977. Information provided on humic substances by  $E_4/E_6$  ratios. Soil Sci. Soc. Am. J. 41, 352-358.
- Chen, Y. y T. Aviad. 1990. Effects of humic substances on plant growth. *En* Humic substances in soil and crop sciences: selected readings. (Ed) P. MacCarthy, C.E. Clapp, R.L. Malcom y P.R. Bloom. American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Chen, Y. y P. Barak. 1983 Iron-enriched peat and lignite as iron fertilizer. p. 195-202. *En* Proc. Int. Symp. Peat Agric. Hort., 2nd, 9-14 oct. 1983. Volcani center, Bet-Dagan, Israel (Ed) K.M. Schallinger.
- Chen, Y. Navrot, J. y P. Barak. 1982a. Remedy of lime-induced chlorosis with iron enriched muk. J. Plant Nutr. 5:927-940.
- Chen Y y M Schnitzer. 1978. The surface tension of aqueous solutions of soil humic substances. Soil Sci. 125:7-15.
- Chen, Y., B. Steintz, A. Cohen y Y Elber. 1982b. the effect of various iron-containing fertilizers on growth and propagations of *Gladiolous grandiflorus*. Sci. Hortic (Amsterdam) 18:169-175.
- Chen, Y. y F.J. Stevenson. 1986. Soil organic matter interactions with trace elements. *En* The role of organic matter in modern agriculture. pp 73-116. (Eds) Y. Chen y Y. Avnimelech. Martinus Nijhoff publishers, Dordrecht.
- Chin Y.; Aiken G., y E. O'Loughlin. 1994. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. Environ. Sci. Technol. 28:1853-1858.
- Cianzio S.R. 1995. Strategies for the genetic improvement of Fe efficiency in plants. *En* Iron nutrition in soils and plants. J Abadía (Ed). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 119-126.
- Comisión de métodos analíticos del Instituto Nacional de Edafología y Agrobiología "José M<sup>a</sup> Albareda". 1973. Determinaciones analíticas de suelos. Normalización de métodos I pH, materia orgánica y nitrógeno. Anal. Edaf. Agrobiol. 32:1153-1172.

## IX Bibliografía

- Crowley, D.E.; Reid, C.P.P. y P.J., Szanizlo. 1988. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Physiol.* 87:680-685.
- Davis, P.P.; Nelson, P.V. y D.C. Sanders. 1994. A humic acid improves growth of tomato seedling in solution culture. *J. Plant Nutr.* 17(1): 173-184.
- Daniels, W.L. y K.C Haering. 1994. Use of sewage sludge for land reclamation in the Central Appalachians. pp 105-121 *En: Sewage Sludge: land utilization and the environment.* (Ed) C.E. Clapp, W.E. Larson y R.H Dowdy. SSSA Miscellaneous Publication ASA-CSSA-SSSA, 677 South Segoe Road, Madison WI 53711, USA.
- De la Guardia, M.D. y E. Alcántara. 1996. Ferric chelate reduction by sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves: influence of light, oxygen, iron-deficiency and leaf age. *J. of Experimental Botany.* 47(298):669-675.
- Dekock, P.C. 1955. The influence of humic acids on plant growth. *Science* (Washington, DC). 121:473-474.
- Díez M.C. 1959. Descomposición fotoquímica de las clorofilas en casos de clorosis férrica inducida. *An. Aula Dei* 6. 1-80.
- Dixit, V.K. y N.Kishore. 1967. Effect of humic acid and fulvic acid fraction of soil organic matter on seed germination. *Indian J. Sci. Ind. Sec. A* 1:202-206.
- Drist , V.A.; B.A. Sakharov; A.L. Salyn y A., Mancea. 1993. Structural model for ferrihydrite. *Clay Minerals* 28:185-207.
- Edwards J.H.; Burt, E.C.; Raper, R.L. y R.H., Walker. 1995. Issues affecting application of noncomposted organic waste to agricultural land. *En Agriculture Utilization of Urban and Industrial by-products.* (Ed) Karlen D.L. R.J. Wright and W.O. Kemper. American Society of Agronomy, Crop science Society of america ASA Special publication no. 58 pp 225-249
- Elliot, H.A. 1986. Land application of municipal sewage sludged. *J. Soil Water conserv.* 41:5-10.
- El-Sherif, A.; Osman A.; Sadik, M. y M., Shata. 1984. Determination of ferrous and ferric iron ratio in spinach plants and their relation to iron application. *J. Plant Nutr.* 7:767-776.
- Fagbenro, J.A. y A.A., Agboola. 1993. Effect of different levels of humic acid on the growth and nutrient uptake of teak seedlings. *J. plant nutr.* 16:(8) pp 1465-1483.
- Farrah, S.R. y G. Bitton. 1990. Viruses in the soil environment. pp 259-551. *En Soil Biochemistry.* vol. 6. (Ed) J.M. Bollag y G. Stotzky. Marcel Dekker, New York.

## IX Bibliografía

- Farrell, J.B. y G., Stern. 1975. Methods for reducing the infection hazard of wastewater sludge. pp. 21-29 *En* Radiation for a clean Soil Biochemistry. vol. 6. (Ed) J.M. Bollag y G. Stotzky. Marcel Dekker, New York.
- Fernández, V.H. 1968. The action of humic acids of different sources on the development of plants and their effect on increasing concentration of nutrient solutions. *Pont. Acad. Sci. Scr. Varia* 32:805-850.
- Flaig W. 1965. Effect of lignin degradation products on plant growth *En* Isotopes and radiation in Soil organic matter studies, International Atomic Energy agency Vienna pp3-19
- Fukushima, M.; Tanaka, S.; Nakamura, H.; Ito, S.; Haraguchi K. y T. Ogata. 1996. Copper (II) binding abilities of molecular weight fractionated humic acids and their mixtures. *Anal. Chimica Acta* (322) 173-185.
- Fortún, C., y C. López-Fando. 1982. Influence of humic acid on the mineral nutrition and the development of maize roots cultivated in normal nutrient solutions and lacking Fe and Mn. *Anales de Edafología Agrobiología* XLI:335-349.
- García, C.; Hernandez, T. y F. Costa. 1991. Changes in carbon fractions during composting and maturation of organic wastes. *Environ. Manage.* 15:433-439.
- García-Mina J.M., Sánchez-Díaz, M. Y J. Iñiguez. The ability of several iron (II)-humic complexes to provide available iron to plants under adverse soil conditions. *En* Iron nutrition in soils and plants. pp 235-240 (Ed) J. Abadía. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Gaur, A.C. 1964. Influence of humic acid on growth and mineral nutrition in plants. *Bull. Assoc. Fr. Etude Sol.* 35:207-219.
- Gerke, J. y U., Meyer. 1995. Phosphate acquisition by red clover and black mustard on a humic podzol. *J. plant nutr.* 18(11) pp 2409-2429.
- Giblin A.E., Luther G.W.III y I. Valiela. 1986. Trace metal solubility in salt marsh sediments contaminated with sewage sludge. *Est. Coastal Shelf Sci.* 23:477-498
- Goenadi, D.H. y I.M., Sudharama. 1995. Shoot initiation by humic acids of selected tropical crops grown in tissue culture. *Plant cell rep.* v. 15(1/2) pp 59-62.
- Gola G.; Negri, G. y C. Cappellratti. 1965. *Trattato di Botanica.* Unione Tipografico-Editrice Torinese.

## IX Bibliografía

- Gouin, F.R. 1985. Growth of hardy Chrysanthemums in containers of media amended with composted municipal sewage sludge. *J. Environ. Hortic.* 3:53-55.
- Gouin, F.R. y J.M. Walker. 1977. Deciduous tree seedling response to nursery soil amended with composted sewage sludge. *Hort. Science* 12:45-47.
- Gu, B.; Schmitt, J.; Chen, Z.; Liang, L. y J.F. McCarthy. 1994. Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: mechanisms and models. *Environ. Sci. Technol.* 28: 38-46
- Guerinot, M.L. y Y. Yi. 1994. Iron: nutritious, noxious and not readily available. *Plant Physiol.* 104:815-820.
- Guggenberger, G.; Haumaier, L.; Thomas, R.J. y W. Zech. 1996. Assessing the organic phosphorus status of an Oxisol under tropical pastures following native savanna using <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Biol-fertil-soils.* v. 23 (3) p. 332-339.
- Guzman M.; Urrestarazu, M. y y L. Romero. 1991. PIron index in horticultural crops *En Iron Nutrition interactions in plants.* pp: 357-361. Y. Chen y A. Abadía (Ed.). Kluwer Academic Publishers.
- Hall, J.E. 1995. Sewage sludge production, treatment and disposal in the European Union. *J. CIWEM.* 9:335-343.
- Hayes, M.H.B. 1985. Extraction of humic substances from soil. pp. 329-363. *En* G.R. Aiken et al (ed.) *Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization.* Wiley-Interscience, New York.
- Hayes, M.H.B 1992. Concepts of the origins, composition and structures of Humic substances *En Advances in soil organic matter research: the impact on agriculture and environment* (Ed) W. S. Wilson The Royal Society of Chemistry pp 3-23
- Henry, C.L.; Cole, D.W.; Hinckley T.E. y R.B. Harrison. 1993. The use of municipal and pulp and paper sludges to increase production in forestry. *J. Sustainable For.* 1:41-55.
- Heras L. 1961. Potencial de óxido reducción en clorosis férrica inducida. *an. Estac. exp. Aula Dei (Zaragoza)* 6:1-80.
- Hernando V. y M. Casado. 1974. Clorosis férrica inducida por Mn en plantas de fresón. *Anal. Edafol. y Agrobiol.* 32 nº1-2.
- Hintz, R.W.; Fehr W.R. y S.R. Cianzio. 1987. Population development for the selection of high-yield soybean cultivars with resistance to iron deficiency chlorosis. *crop Sci.* 27:707-710.



## IX Bibliografía

- Hiscox J.D. e Israelstam G.F. (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can J. Bot.* 57 1332-1334.
- Hoitink, H.A.J. 1994. Beneficial effects induced by composted biosolids in horticultural crops. pp 95-100 *En: Sewage Sludge: land utilization and the environment.* (Ed) C.E. Clapp, W.E. Larson y R.H. Dowdy. SSSA Miscellaneous Publication ASA-CSSA-SSSA, 677 South Segoe Road, Madison WI 53711, USA.
- Hoitink, H.A.J.; Boehm, M.J. y Y. Hadar. 1993. Mechanisms of suppression of soilborne plant pathogens in compost-amended substrates. pp 601-621. *En Science and engineering of composting: Design, environmental, microbiological and utilization aspects.* (ed) H.A.J. Hoitink y H.M. Keener. Renaissance Publ., Worthington, OH.
- Holden M.J., Luster D.G., Chaney R.L., Buckhout T.J. y C. Robinson. 1991. Fe<sup>3+</sup>-chelate reductase activity of plasma membranes isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) roots: Comparison of enzymes from Fe-deficient and Fe-sufficient roots. *Plant Physiol.* 97,537-544.
- Hue, N. V., G.R. Craddock y F. Adams. 1986. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Am. J* (50): 28-34
- Huffman, E.W.D. y H.A. Stuber. 1985. Analytical methodology for elemental analysis of humic substances. pp. 433-457. *En Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization.* (Ed) G.R. Aiken y col. Wiley-Interscience, New York.
- Irintoto, B.; Tan, K.H. y H.F., Sommer. 1993. Effect of humic acid on callus culture of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm). *J. Plant Nutr.* v. 16 (6) pp 1109-1118.
- Ishiwatari, R. 1967. Infrared absorption band at 1540 cm<sup>-1</sup> of humic acid from recent lake sediment. *Geochem. J.* 1:61-67
- Ishiwatari, R. 1985. Geochemistry of humic substances in lake sediments. pp. 147-181. *En Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization.* (Ed) G.R. Aiken y col. Wiley-Interscience, New York.
- Ivanova, L.V. 1965. Influence of humic substances on growth of excised maize roots. *Dokl. Akad. Nauk. BSSR* 9:255-257.
- Jaspar E.M.J. 1965. Pigmentation of tobacco Crown-Gall tissues cultures in vitro in dependence of composition of the medium. *Physiol. Plant.* 18:933-940
- Jing, J. y T.J. Logan. 1992. Effects of sewage sludge cadmium concentration on chemical extractability and plant uptake. *J. Environ. Qual.* 21:73-81.

## IX Bibliografía

- Jolley V.D. y J.C. Brown. 1987. Soybean response to iron deficiency stress related to iron supply in the growth medium. *J. Plant Nutr.* 10:637-651.
- Jones, R.I.; Shaw, P.J. y H. de Haan. 1993. Effects of dissolved humic substances on the speciation of iron and phosphate at different pH and ionic strength. *Environ. Sci. Technol.* 27:1052-1059
- Jones, J.B.Jr.; Wolf, B. y H.A. Mills. 1991. Plant analysis handbook. Micromacro Pub. Inc.
- Keeney, D.R. 1982 Nitrogen managment for maximum efficiency and minimun pollution pp. 605-649. *En Nitrogen in agriculture soils.* (ed) F.J. Stevenson Agron. Monogr. 22 ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI.
- Keeney, D.R.; Lee, K.W. y L.M. Walsh. 1975. Guidelines for the application of wastewater sludge to agricultural land in Wisconsin. Wisconsin Dep. Nat. Resour. Tech. Bull. Wisconsin Dep. Nat. Resour., Madison.
- Khristeva, L. 1949. Nature of the effect of humic acids on the plant. *Dokl. Vses. Akad. Skh. Nauk im. V.I. Lenina.* vol 7.
- Kinnersley, A.M. 1993. The role of phytochelates in plant growth and productivity. *Plant Growth Regul.* 12(3): 207-218.
- Kononova, M.M. y N.A. Pankanova. 1950. The action of humic substances on the growth and development of plants. *Doklady. SSSR* 73:1069-1071.
- Kreij, C. y H., Basar. 1995. Effect of humic substances in nutrient film technique on nutrient uptake. *J. Plant Nutr.* 18(4):793-802.
- Kuiters A.T. y W. Mulder. 1992. Gel permeation chromatography and Cu-binding of water- soluble organic substances from litter and humus layers of forest soils. *Geoderma* 52:1-15
- Kumada 1987 Chemistry of Soil Organic matter Japan Scientific Societies Press Tokyo/Elsevier
- Lamrani, Z. 1995. Comportamiento de algunos órganos del pepino holandés (*Cucumis sativus* L. c.v. Brunex) sometidos a la acción del N, P, y K. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Leenheer, J.A. 1981 Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. *Environmental Science Technology.* 15:578-587
- Lemunyon, J.L. y R.G., Gilbert. 1993. The concept and need for a phosphorous assessment

## IX Bibliografía

---

- tool. J. Prod. Agric. 6:483-486.
- Linehan, D.J. y H., Shepherd. 1979. A comparative study of the effects of natural and synthetic ligands on iron uptake by plants. *Plant and Soil* 52: 281-289
- Lindsay, W.L. 1979. Chemical equilibria in soils. Ed. John Wiley and sons.
- Lindsay, W.L. 1995. Chemical reactions in soils that affect iron availability to plants. *En Iron nutrition in soils and plants*. pp.7-14 (Ed) J. Abadía. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Lobartini, J. y G., Orioli. 1988. Absorption of iron humate in nutrient solutions by plants. *Plant and Soil*. 106:153-157
- Logan, T.J. y J.C., Burnham. 1995. The alkaline stabilization with accelerated drying process (N-viro): An advanced technology to convert sewage sludge into a soil product. *En Agriculture Utilization of Urban and Industrial by-products*. pp 209-224. (Ed) Karlen D.L. R.J. Wright and W.O. Kemper. American Society of Agronomy, Crop science Society of america ASA Special publication nº 58.
- Logan, T.J., Faber, W.R. y E.M. Smith. 1984. Use of composted sludge on different crops. *Ohio. Rep.* 3:37-40.
- Loppert, R.; S. Geiger; Hartwing, R. y O., Morris. 1988. A comparison of indigenous soil factors influencing the Fe-deficiency chlorosis of Sorghum and soybean in calcareous soil. *J. Plant Nutr.* 11:1481-1492.
- Loue, A. 1986. Les oligo-elements in Agriculture. Agri-Natahan. International. Paris
- Lu N.; Edwards J.H. y J.S. Walker. 1995. Organic wastes and Nitrogen sources interaction on soil solution ionic activity. *Compost. Sci. Utilz.* 3(1):6-18.
- Lucena, J.J. y I. Bascones. 1993. AB-DTPA cation extraction in spanish soil samples. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 24(17-18):2427-2440.
- Lucena J.J. 1990. La clorosis férrica. *Agrícola Vergel.* 4:296-301
- Lucena J.J. 1995. Iron fertigation. *En Iron nutrition in soils and plants*. pp 153-158. (Ed) J. Abadía. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Lucena J.J. 1998. Effect of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on Fe chlorosis.
- Lulakis, M.D. y S.I., Petsas. 1995. Effect of humic substances from vine-canes mature compost on tomato seedling growth. *Bioresour. Technol.* 54(2):179-182.

## IX Bibliografía

- Luther III, G. W.; Shellenbarger P. A. y P.J., Brendel. 1996. Dissolved organic Fe(III) and Fe(II) complexes in salt marsh porewaters. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 60(6):951-960.
- MacCarthy, P. y J.A. Rice. 1985. Spectroscopic methods (other, than NMR) for determining functionality in humic substances. *En Humic substances in Soil, Sediment and Water.* pp 527-559 (Eds) G. R. Aiken, D. McKnight, R.L. Wershaw y P. MacCarthy. Wiley, New York.
- MacCarthy, P. y col.1990. *En Humic substances in soil and crop sciences: selected readings.* (Ed) P. MacCarthy y col. American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Maggioni, A.; Varanini, Z.; Pinton, R. y M.G. De Biasi. 1992. Humic substances affect transport properties of root membranes. *Dev. Agric. Manage. For Ecol.* 25:137-144.
- Malcom, R.L. 1985. Geochemistry of stream fulvic and humic substances. *En Humic substances in Soil, Sediment and Water.* pp 181-210. (Eds) G. R. Aiken, D. McKnight, R.L. Wershaw y P. MacCarthy. Wiley, New York.
- Mantoura, R.F.C. y Riley J.P. 1975. The use of gel filtration in the study of metal binding by humic acids and related compounds. *Anal. Chim. Acta.* 78:193-200.
- Manzanares M. 1991. Evaluación de la eficacia de quelatos de hierro como correctores de la clorosis férrica. Aplicación al cultivo de fresón. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Manzanares M., Lucena J.J. y Gárate A., 1990. Iron(II) determination in leaves of strawberry (*Fragaria vesca*). *En Plant Nutrition, Physiology and Applications.* pp 805-808. (Ed.) M.L. van Beusichem. Kluwer Academic Publishers.
- Marschner, H. 1986. Areas where future research on uptake and translocation of iron should be focussed. *J. Plant. Nutr.* 9:1071-1076.
- Marschner, H.; Römheld, V. y M. Kissel. 1986. Different strategies of higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9:695-714.
- Marschner, H.; Römheld, V. y M. Kissel. 1987. Localization of phytosiderophore release and of iron uptake along intact barley roots. *Physiol. Plant.*, 71:757-762.
- Marschner, H. y V. Römheld. 1995. Strategies of plant acquisition. *En Iron nutrition in soils and plants.* pp. 375-388 (Ed) J. Abadía. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

## IX Bibliografía

- Marschner H., Römheld V. y F. Zhang. 1990. Mobilization of mineral nutrients in the rizosphere by root exudates. Transactions 14th Inter. Congress of soil science, Kyoto, Japan.
- Mato, M.C., R. Fabregas y J. Mendez. 1971. Inhibitory effect of soil humic acids on indoleacetic acid oxidase. *Soil Biol. Biochem.* 3:285-288.
- Mato, M.C., M.G. Olmedo y J. Mendez. 1972a. Inhibition of indoleacetic acid oxidase by soil humic acids fractionated with Sephadex. *Soil Biol. Biochem.* 4:469-473.
- Mato, M.C., L.M. Gonzalez-Alonso y J. Mendez. 1972b. Inhibition of enzymatic indoleacetic acid oxidation by fulvic acids. *Soil Biol. Biochem.* 4:475-478.
- McBride M.B. 1995. Toxic metal accumulation from agricultural use of sludge: are USEPA regulations protective?. *J. Environ. Qual.* 24:5-18. 1990. Vol II pp. 158-163. Ed por Masayoshi Koshino.
- McKeague, J.A. M.V. Cheshire, F. Andrex, y J. Berthelin, 1986. Organo-mineral complexes in relation to pedogenesis. *En Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes* pp. 549-592. (Ed) P.M. Huang y M. Schnitzer, Madison, WI: Soil Science ociety of America.
- McKenna, I.M.; Chaney, R.L.; Tao, S.H.; Leach Jr., R.M. y F.M. Williams. 1992. Interactions of plant zinc and plant species on the bioavailability of plant cadmium to japanase quail fed lettuce and spinach. *Environ. Res.* 57:73-87.
- Mckinney G (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions *J. Biol. Chem* 40 315-332
- Mengel, K. y E. Kirby, 1982. Principles of plant nutrition. International Potash Institute. Bern, Switzerland.
- Michalas, F., V. Glavac y H. Parlat 1992. The detection of aluminum complexes in forest soil solutions and beech xylem saps. *Fresenius J. Anal Chem* 343:308-312
- Miller, G.; Pushnik, J. y G. Welkie, 1984. Iron chlorosis, a world wide problem. The relation of chlorophyll biosynthesis to iron. *J. Plant Nutr.* 7:1-22.
- Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación. 1994 Métodos Oficiales de Análisis. Ed. Secretaria general técnica. M.A.P.A. Tomo III.
- Mojé, W. 1966. Organic soil toxins *En Diagnostic criterion for plan and soils.* (Ed) H.D. Chapman University of California press Berkeley pp 533-569.
- Monge E., Val J., Heras L y J. Abadía. 1987. Photosynthetic pigments composition of

## IX Bibliografía

- higher plants grown under iron stress. *En* Progress in Photosynthesis Research Vol. IV Ed J. Biggens. pp. 201-204. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Moog P.R. y W. Brüggemann. 1994. Iron reductase systems in the plant plasma membrane. A review. *Plant Soil*. 165:241-260.
- Morrison, R.T. y R.N. Boyd. 1985. Química orgánica. Segunda edición. Fondo educativo interamericano. Méjico.
- Mortvedt, J.J. 1991. Correcting iron deficiencies in annual and perennial plants: present technologies and future prospects. *Plant Soil* 130:273-279.
- Mortvedt, J.J. 1997. Use of industrial by-products as micronutrient fertilizers. *Proc. Dahlia Greidinger Int. Symposium, Fertilization and the environment* 337-345.
- Muscolo, A.; Panuccio, M.R.; Abenavoli, M.R.; Concheri, G. Y S. Nardi. 1996. Effect of molecular complexity and acidity of earthworm faeces humic fractions on glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and phosphoenolpyruvate carboxylase in *Daucus carota* alpha II cells. *Biol. Fertil. Soils*. 22 (1&2):83-88.
- Nardi S.; Concheri, G.; Dell'Agnola, G. y P. Scrimin. 1991. Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions. *Soil Biol. Biochem.* 23(9):833-836.
- Nelson E.B. y C.M. Craft. 1992. Suppression of dollar spot on creeping bentgrass and annual bluegrass turf with compost-amended topdressings. *Plant Dis.* 76:954-958.
- Neilands, J. y S. Leong. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:187-208.
- Nishio J.N., Taylor S.E. y N. Terry. 1985. Changes in thylakoid galactolipids and proteins during iron nutrition-mediated chloroplast development. *Plant Physiol.* 77:705-711.
- Norvell, W.A. y W.L. Lyndsay. 1982. Estimation of the concentration of  $\text{Fe}^{3+}$  and the  $(\text{Fe}^{3+})(\text{OH})_3$  ion produce from equilibria od EDTA in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46:710-715.
- Oberle S.L. y D.R. Keeney, 1994 Interactions of sewage sludge with soil-crop-water systems *En: Sewage Sludge: land utilization and the environment*. pp 17-20. (Ed) C.E. Clapp y col. SSSA Miscellaneous Publication ASA-CSSA-SSSA. Madison.
- O'Connor G.A. 1994. Sewage sludge: Toxic Organic considerations *En: Sewage Sludge: land utilization and the environment*. pp 33-34. (Ed) C.E. Clapp y col. SSSA Miscellaneous Publication ASA-CSSA-SSSA. Madison.

## ***IX Bibliografía***

---

- O'Donnell, R.W. 1973. The auxin-like effects of humic preparations from leonardite. *Soil Sci.* 116:106-112.
- Olmos, S. 1993. Caracterización y propiedades químicas de sustancias húmicas comerciales. Tesina de licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid.
- Olmos, S., Esteban, E. y Lucena J.J., 1998. Micronutrient extraction in calcareous soils treated with humic substances. *J. Plant Nutr.* 21(4):687-697.
- Onken, B.M. y S.J. Traina. 1997. The sorption of nonionic organic solutes to humic acid-mineral complexes: effect of cosolutes. *J. Environ. Qual.* 26(1):132-138.
- Palazzo, A.J. e I. K. Iskandar. 1994. Use of sewage sludge on park and recreational lands; *En: Sewage Sludge: land utilization and the environment.* pp 101-103. (Ed) C.E. Clapp y col. SSSA Miscellaneous Publication ASA-CSSA-SSSA, 677 South Segoe Road, Madison WI 53711, USA.
- Parfitt, R.L.; Fraser, A.R. y V.C. Farmer. 1977. Adsorption on hydrous oxides III. Fulvic and humic acid on goethite, gibbsite and imogolite. *J. Soil Sci.* 28:289-296.
- Parfitt, R.L y J.D. Russell 1977. Adsorption on hydrous oxides IV. Mechanisms of adsorption of various ions on goethite. *J. Soil Sci.* 28:297-305
- Patterson, H.H.; MacDonald, B.; Fang, F. y C. Cronan. 1996. Enhancement of the water solubility of organic pollutants such as pyrene by dissolved organic matter. ACS symposium series; 0097-6156; 651. Humic and fulvic acids isolation, structure, and environmental role pp. 288-298.
- Piccolo, A.; Nardi, S. y G., Concheri. 1992. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil. Biol. Biochem.* 24(4):373-380.
- Piccolo, A.; Nardi, S. y G., Concheri. 1996. Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. *Environ. J. Soil Sci.* :319-329.
- Pierzynski, G. M. 1994. Plant nutrient aspects of sewage sludge *En: Sewage Sludge: land utilization and the environment.* pp 21-25. (Ed) C.E. Clapp y col. SSSA Miscellaneous Publication ASA-CSSA-SSSA. Madison.
- Pinton, R.; Cesco, S.; Santi, S y Z., Varanini, Z. 1995. Effect of soil humic substances

## IX Bibliografía

- on surface redox activity of oat roots. *J. Plant Nutr.* 18(10):2111-2120.
- Perdue, E.M y C.R., Lytle. 1983. A distribution model for binding of protons and metal ions by humic substances. *Environ. Science and Technol.* 17:654-660.
- Perdue, E.M 1985. Acidic functional groups of humic substances. *En Humic substances in Soil, Sediment and Water.* pp 527-559. (Eds) G. R. Aiken y col. Wiley, New York.
- Perdue, E.M. 1990. Modeling the Acid-Base chemistry of organic acids in laboratory experiments and in freshwaters. *En Organic acids in aquatic ecosystems.* pp 111-125. (Eds) Perdue E.M. and Gjessing E.T. John Wiley & Sons Ltd.
- Pérez-Sanz, A.; Álvarez-Fernández, A. y Lucena J.J. 1997. Foliar Application of seaweed extract ammended with iron as an alternative to synthetic chelates to alleviate iron chlorosis in fruit trees. *Proc. Dahlia Greidinger Int. Symposium, Fertilization and the environment* 415-420.
- Pohlam, A.A. y J.A. McCall. 1986. Kinetics of metal dissolution from forest soils by soluble organic acids. *J. Environ. Qual.* (15):86-92.
- Povoledo, D.; Murray, D. y M., Pitze. 1975. Pigments and lipids in the humic acids of same canadian lakes sediments. *En Humic substances, their structure and function in the biosphere.* pp 233-258. (Eds). Povoledo, D. y H.L. Golterman. Centre for Agricultural Publications and Documentation, Wageningen.
- Powell, P.E.; Cline, G.; Reid, C.P.P. y J.P., Sraniszlo. 1980. Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in Soils. *Nature.* 287:833-834.
- Powell, P.E.; Sraniszlo, J.P.; Cline, G. y C.P.P. Reid. 1982. Hydroxamate siderophore iron siderophores in the iron nutrients of plants. *J. Plant Nut.* 5:653-673.
- Qualls R. G. y B.L. Haines. 1992 Biodegradability of dissolved organic matter in forest throughfall, soil solution, and stream water. *Soil Sci. Soc. Am. J.* (56):578-586.
- Ramos, I 1994. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Rauthan, B.S., y M. Shnitzer, 1981. Effects of soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Plant and Soil.* 63:491-495
- Requena, N.; Azcon, R. y M.T. Baca. 1996. Chemical changes in humic substances from compost due to incubation with ligno-cellulolytic microorganisms and effects on lettuce growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45(6):857-863.



## IX Bibliografía

- Riffaldi, R., F. Sartori y R. Levi-Minez. 1982. Humic substances in sewage sludge. *Environ. Pollut. Ser. B* 3:139-146.
- Riekirk, H y D.W. Cole, 1976; Chemistry of soil and groundwater solutions associated with sludge applications. *En Use of dewatered sludge as an amendment for forest growth* pp 50-59. (ed) R. L. Edmonds y D.W. Cole. Vol.1. Inst. Forest Resourc. Univ. of Washington, Seattle.
- Romera, F.J.; E., Alcántara y M.D. de la Guardia. 1992. Effects of bicarbonate, phosphate and high pH on the reducing capacity of Fe-deficiency sunflower and cucumber plantas. *J. Plant Nutr.* 15:1519-1530.
- Römheld, V. y H. Marschner. 1990. Genotypical differences among gramineous species in release phytosiderophores. *Plant and Soil.* 123:147-153.
- Saleh F.Y, Ong W.A y D.Y. Chang. 1989. Structural features of aquatic fulvic acids. Analytical and preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography separation with photodiode array detection. *Anal. Chem.* 61:2792-2800.
- Sanchez-Conde, M.P. y C.B. Ortega. 1968. Effect of humic acid on the development and the mineral nutrition of pepper plant. p. 745-755 *En Control de la ferertilización de las plantas cultivadas, 2º Coloquio Evr. Med. Cent. Edafol. Biol. Aplic., Sevilla.*
- Sanchez-Conde, M.P., C.B. Ortega y Pérez Brull. 1972. Effect of humic acid on the sugar beet in hydroponic culture. *Anales de Edafología y Agrobiología.* 31:319-331.
- Sanderson, K.C., y W.C. Martin, Jr. 1974. Performance of woody ornamentals in municipal compost media under nine fertilizer regimes. *Hort. Science.* 9:242-243
- Sanz, M., Caverio, J. y J. Abadía. 1992. Iron chlorosis in the Ebro river basin, Spain. *J. Plant Nut.* 15(10):1971-1981.
- S.A.S. Institute, Inc. 1985. SAS User's Guide: Statistic version. 5th ed. Statistica Analysis System Institute, Inc., Cary, NC.
- Sastre, I.; Vicente, M.A.; Lobo, M.C. 1996. Influence of the application of sewage sludge on soil microbial activity. *Bioresour. Technol.* 57(1):19-23.
- Schaumberg, G.D., K.M. Holtzclaw, C.S. LeVesque y G. Sposito. 1982. Characterization of sulfur in fulvic acids extracted from anaerobically digested sewage sludge. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 46:310-314.

## IX Bibliografía

- Schulten, H.R. 1996 A new approach to the structural analysis of humic substances in water and soils: humic acid oligomers. *En* Humic and fulvic acids isolation, structure, and environmental role. pp 42-56. ACS symposium series. Washington, American Chemical Society
- Schnitzer, M. 1972 Chemical, spectroscopic, and thermal methods for the classification and characterization of humic substances. Proc. Intern. Meetings on Humic Substances, Pudoc, Wageningen. pp 293-310.
- Schnitzer M. 1986. Binding of humic substances by soil mineral colloids. *En* Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes. pp 77-102. (Eds) P.M. Huang y M. Schnitzer. Soil Science Society of America. Madison, WI
- Senesi, N. y E. Loffredo. 1994. Influence of soil humic substances and herbicides on the growth of pea (*Pisum sativum* L.) in nutrient solution. J. Plant. Nutr. 17:(2&3):493-500.
- Senesi, N y C., Steelink. 1989. Application of ESR Spectroscopy to the study of the humic substances. *En*: Humic Substances II. In search of sructure. pp 337-408: (Ed) M.H.B. Hayes, P. Mac Carthy, R.L. Malcolm, y R.S. Swift. John Wiley & Sons Ltd.
- Shore, L.S.; Hall, D.W. y M., Shemesh. 1997. Strogen and testosterone in ground water in the Chesapeake bay watershed. Dahlia Greidinger Int. Symposium, Fertilization and the environment 250-255.
- Sims J. y Bingham F. 1968. Retention of boron by layer silicates, sesquioxides and soil materials. II. Soil Sci. Amer. Proc. 32:364-369.
- Singhvi, N.R. 1991. Effect of certain growth regulators on seedling growth, dry matter production and chlorophyll biosynthesis in *Raphanus sativus*. Acta. Bot. Indica. 19(1):97-99.
- Smidova, M. 1962. Effect of Sodium humate on swelling and germination of plant roots. Biol. Plant. 4:112-118.
- Soltanpour P.N. y Schawb, A.P. 1977. A new soil test for simultaneous extraction of macromutrients and micronutrients in alkaline soils. Comm. Soil Sci. Plant Anal. 8:195-207
- Sommers L.E. 1977 Chemical composition of sewage sludges and analysis of their potential use as fertilizers. J. Environ. Qual. 6:225-232.

## IX Bibliografía

- Sonneveld, C. y P.S. van Dijk. 1982. The effectiveness of some washing procedures on the removal of contaminants from plant tissues samples of greenhouse crops. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 13:487-497.
- Sposito, G. 1984. *The surface Chemistry of soils*; Oxford University press; New York
- Sposito, G., K.M. Holtzclaw, y J. Baham 1976. Analytical properties of the soluble, metal complexing fractions in sludge-soil mixtures:II. Comparative structural chemistry of fulvic acids. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 40:691-697.
- Sposito G. y A.L. Page. 1984. Cycling of metal ions in the soil environment. En *Metal ions in biological system: Circulation of metals in the environment* pp. 287-322. H. Siegel (Eds) Marcel Dekker, New York.
- Steelink, C.; Wershaw, R.L.; Thorn, K.A. y M.A. Wilson. 1989. En Humic Substances II. In search of structure. pp 281-308. (Ed) M.H. B. Hayes, P. Mac Carthy, R.L. Malcolm, y R.S. Swift. John Wiley & Sons Ltd.
- Steelink, C. 1985. Implications of elemental characteristics of humic substances En Humic substances in Soil, Sediment and Water. pp 457-477. (Eds) G.R. Aiken, D. McKnight, R.L. Wershaw y P. MacCarthy. Wiley, New York.
- Stevenson, F.J. 1982. *Humus Chemistry; Genesis, Composition, reactions*. Wiley-Interscience. New York.
- Stevenson, F.J. 1986. *Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*, Wiley, New York.
- Stevenson, F.J. 1991. Organic matter-micronutrient reaction in soil. En *Micronutrients in Agriculture* pp 145-186. J.J. Mortvedt, F.R. Fox, L.M. Shuman y R.M. Welch. (Eds). American Society of Agronomy. science. Madison.
- Stevenson, F.J. 1985. Geochemistry of soil humic substances. En Humic substances in Soil, Sediment and Water. pp 13-54. (Eds) G.R. Aiken, D. McKnight, R.L. Wershaw y P. MacCarthy. Wiley, New York.
- Stevenson, F.J. 1994. *Humus Chemistry; Genesis, Composition, reactions*. 2nd Edition. Wiley-Interscience. New York.
- Stevenson, F.J. y M.S., Ardakani. 1972. Organic matter interactions involving micronutrients in soils En *Micronutrients in Agriculture*. pp. 79-114. (Eds) J.J. Mortvedt. Soil Science Society of America. Madison, WI
- Stevenson, F.J. y A. Fitch. 1986. Chemistry of complexation of metal ions with soil solution

## IX Bibliografía

---

- organics *En* Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes pp. 29-58. (Eds) P.M. Huang y M. Schnitzer. Soil Science Society of America. Madison, WI
- Stevenson, F.J. y K.M. Goh. 1971. Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochim. Cosmochim. Acta* 35:471-483
- Stookey L.L. 1970. Ferrozine a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* 41:779-782.
- Susín, S.; Abadía, A.; González-Reyes, J.A.; Lucena, J.J. y J. Abadía. 1996. The pH requirement for in vivo activity of the iron deficiency-induced "turbo" ferric chelate reductase. *Plant Physiol.* 110:111-123.
- Tabares J.M. 1977. Cultivo en invernadero. *En*: Caja Insular de Ahorros de Gran Canaria ed. *El Tomate*. España: Xoba Pub., 1-14
- Tabares J.M y Álamo M. 1992. Experiencia comparativa de variedades de tomate tipo ensalada en cultivo de primavera-verano bajo malla especial y aire libre (Campaña 90-91). *Agrícola Vergel* 123, 165-168
- Tagaki, S., Nomoto, K. y T. Takemoto. 1984. Physiological aspects of mugenic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *J. Plant Nutr.* 7:469-477.
- Tan, K.H. y V. Nopamornbodi. 1979. Effect of different levels of humic acids on nutrient content and growth of corn (*Zea Mays* L.). *Plant Soil* 51:283-287.
- Terry, N y A.M. Zayed. 1995. Physiology and biochemistry of leaves under iron deficiency. *En* Iron nutrition in soils and plants. pp 283-294. (Ed) J. Abadía. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Terry R.E., Nelson D.W. y L.E. Sommers. 1979. Carbon cycling during sewage sludge decomposition in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45:494-499.
- Theil, E.C. 1987. Ferritin: structure, gene regulation and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* 56:289-315.
- Tipping E. 1978. The adsorption of humic substances by iron oxides. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 45 191-199.
- Tisserat, B. y J.A. Manthey. 1996. In vitro sterile hydroponic culture system to study iron chlorosis. *J. Plant Nutr.* 19(1):129-143.
- Uren, N. 1984. Forms, reactions and availability of iron in soils. *J. Plant Nutr.* 7:165-176.

## IX Bibliografía

H.A.J. Hoitink y H.M. Keener. Renaissance Publ., Worthington, OH.

Walker J.M. 1994. Production, use and creative design of sewage sludge biosolids. *En* Sewage Sludge: land utilization and the environment. pp 67-74. (Ed) C.E. Clapp y col. SSSA Miscellaneous Publication ASA-CSSA-SSSA. Madison WI.

Whalen, J.K. y P.R. Warman. 1996. Arylsulfatase activity in soil and soil extracts using natural and artificial substrates. *Biol. Fertil Soils*. 22(4):373-378.

Wang, X.J.; Wang, Z.Q. y S.G. Li. 1995. The effect of humic acids on the availability of phosphorus fertilizers in alkaline soils. *Soil Use Manage*. 11(2):99-102.

Wershaw, R.L. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining functionality in humic substances. *En* Humic substances in Soil, Sediment and Water. pp 561-583. (Eds) G. R. Aiken, D. McKnight, R.L. Wershaw y P. MacCarthy. Wiley, New York.

White, M.C. and R.L. Chaney. 1980. Zinc, cadmium and manganese uptake by soybean from two zinc and cadmium amended coastal plain soils. *Soil Sci. Soc. Am. J*. 44:308-313.

Whitehead, D.C. y J. Tinsley. 1964. Extraction of soil organic matter with dimethylformamide. *Soil Sci*. 97:34-42.

Wilson, M.A. 1989. Solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy of humic substances: basic concepts and techniques. *En*: Humic Substances II. In search of structure. pp 309-338. (Ed) M.H.B. Hayes, P. MacCarthy, R.L. Malcolm, y R.S. Swift. John Wiley & Sons Ltd.

Wilson, M.A. 1990. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to organic matter in whole soils. *En* Humic substances in Soil and Crop Sciences: Selected readings. pp 221-260 (Eds) P. MacCarthy, C.E. Clapp, R. L. Malcolm, y P.R. Bloom. American Society of Agronomy, Madison.

Wolt, J. 1994. Soil solution chemistry. Applications to environmental science and agriculture. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Zaharieva, T. 1995. Iron-manganese interactions in peanut plants as influenced by the source of applied iron. pp. 277-282. *En* Iron Nutrition in Soils and Plants. A. Abadía (Ed.). Kluwer Academic Publishers.

Zaharieva, T.; Kasabov, D y V. Römheld. 1988. Response of peanuts to iron-

## IX Bibliografía

- Val J., Heras L. y J. Abadía 1987. changes in photoynthetic pigment composition in higher plants as affected by iron nutrition status. *J. Plant Nutr.* 10(9-16):995-1001.
- Valenzuela, J.L.; Alvarado, J.J.; Sánchez A. y L. Romero. 1995. Influence of N, P and K treatments of several physiological and biochemical iron indicators in melon plants irrigated with brackish water. *En Iron Nutrition in Soils and Plants.* pp. 135-141. A. Abadía (Ed.). Kluwer Academic Publishers.
- Valenzuela, J.L.; Sánchez A. y L. Romero. 1991. Physiological plant agea dependent biochemical indicators and physiological parameters of iron nutrition. *En Iron Nutrition interactions in plants.* pp. 107-116. Y. Chen y A. Abadía (Ed.). Kluwer Academic Publishers.
- Van Genuchten, M.; Davison, J.M. y P.J. Wierenga. 1974. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 38:29-35
- Vaughan, D. 1967. The stimulation of invertasa development in aseptic storage tissues slices by humic acids. *Soil Biol. Biochem.* 1:15-28.
- Vaughan, D., R.E. Malcom y B.G. Ord. 1985. Influence of humic substances on biochemical processes in plants. p 77-108 *En Soil Organic matter and biological activity* (Ed) D. Vaughan y R.E. Malcom. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., Dordrecht.
- Vaughan, D. y I.R. McDonald. 1971. Effects of humic acid on protein synthesis and ion uptake by beet discs. *J. Exp. Bot.* 22:400-410.
- Vaughan, D. y I.R. McDonald. 1976. Some effects of humic acid on the cation uptake by parenchyma tissue. *Soil Biol. Biochem.* 8:415-421.
- Vaughan, D. y B.G. Ord. 1981. Uptake and incorporation of <sup>14</sup> C-labelled soil organic matter by roots of *Pisum sativum* L. *J. Exp. Bot.* 32:679-687.
- Vempati, R.K. y R.H. Loeppert. 1986. Synthetic ferrihydrite as a potential Fe amendment in calcareous soil. *J. Plant Nutr.* 9:1030-1052.
- Visser, S.A. 1983 water resource., 17 1393.
- Vogt, K.A.; Edmonds, R.L. y D.J. Vogt. 1980. Regulation of nitrate levels in sludge, soil and groundwater. *En Use of dewatered sludge as an amendment for forest growth.* pp 53-65. (Ed) R.L. Edmonds y D.W. Cole. Vol.3. Inst. Forest Resourc. Univ. of Washington, Seattle.
- Vogtman, H., Matthies, K., Kheres, B. y A. Meier-Ploeger. 1993. Enhanced food quality induced by compost applications. *En Science and engineering of composting: design, environmental, microbiological and utilization aspects.* (Ed.)

### ***IX Bibliografia***

---

manganese interaction in calcareous soli. J. Plant Nut. 11:1015-1019.

## **ANEXO I**



## ANEXO I

Tabla I. Concentración de micronutrientes solubles (mg·L<sup>-1</sup>) en el extracto del ensayo de interacción del Aquamato férrico con los materiales del suelo.

Fe	Blancos			
Patrón de suelo	0,048	0,461	0,705	0,927
Mont	0,458	0,359	0,345	0,272
Ac Húmico	116,72	91,12	98,08	94,6
Fe(OH)3	0,327	0,271	0,07	0,032
CaCO3	0,02	0,032	0,008	0,025
Valencia	0,04	0,027	0,036	0,054
Cu				
Patrón de Suelo	0,089	0,047	0,05	0,052
Mont	0,007	0,018	0,017	0,012
Ac Húmico	0,113	0,084	0,127	0,176
Fe(OH)3	-0,002	0,004	-0,001	-0,001
CaCO3	0	0,004	0,007	0,002
Valencia	0,005	0,006	0,007	0,004
Mn				
Patrón de suelo	0,166	0,04	0,047	0,04
Mont	0,025	0,015	0,013	0,01
Ac Húmico	0,218	0,262	0,177	0,209
Fe(OH)3	0,012	0,004	0	0,002
CaCO3	0,007	0,013	0,013	0,009
Valencia	0,014	0,013	0,015	0,026
Zn				
Patrón de suelo	0,368	0,263	0,269	0,206
Mont	0,049	0,065	0,078	0,067
Ac Húmico	0,042	0,575	0,851	0,756
Fe(OH)3	0,012	0,045	0,036	0,039
CaCO3	0,019	0,028	0,043	0,024
Valencia	0,043	0,023	0,045	0,031

## ANEXO I

Tabla II. Concentración de macronutrientes solubles (mg·L<sup>-1</sup>) en el extracto del obtenido tras el ensayo de interacción del Aquamato férrico con los materiales del suelo.

Ca	Blancos			
Patrón de suelo	25,9	26,7	31,2	33,8
Mont	6,7	6,1	7,7	6,5
Ac Húmico	50,7	55,6	38,7	41,1
Fe(OH)3	0,1	0,6	0,8	23,8
CaCO3	5,5	100,7	70,3	78,6
Valencia	76,2	90,9	126,7	184
Mg				
Patrón de suelo	3,7	17,5	18,9	13,1
Mont	1,8	23,7	19	17
Ac Húmico	3,1	9,5	5,1	6,6
Fe(OH)3	0	26,7	10,9	26,7
CaCO3	0,3	33,9	23,1	29
Valencia	9,1	23,2	22,4	24,5
K				
Patrón de suelo	5,5	7,8	6,9	19,2
Mont	0,7	1,3	1	1,3
Ac Húmico	2,1	2,1	0,8	3,2
Fe(OH)3	-0,6	-0,8	0,5	-0,9
CaCO3	-0,5	-0,2	-0,2	-0,4
Valencia	12,7	16,7	15,3	18,1
Na				
Patrón de suelo	141	126	162	177
Mont	19,7	56,4	57,4	63,8
Ac Húmico	406	532	291	389
Fe(OH)3	7,6	17,9	16,5	16,8
CaCO3	7,7	7,7	6,6	7,9
Valencia	6,8	8,3	8,2	8,3

## **ANEXO I**

**Tabla III. Concentración de micronutrientes solubles (mg·L<sup>-1</sup>) en el extracto del ensayo de interacción del Doliron con los materiales del suelo.**

<b>Fe</b>	<b>Blancos</b>			
Patrón de suelo	0,048	0,402	0,601	1,044
Mont	0,458	0,051	0,032	0,063
Ac Húmico	116,72	287,55	159,36	107,04
Fe(OH)3	0,327	0,103	0,07	0,528
CaCO3	0,02	0,021	0,017	0,028
Valencia	0,04	0,552	0,432	0,35
<b>Cu</b>				
Patrón de suelo	0,089	0,006	0,005	0,064
Suelo art				
Mont	0,007	-0,001	0,003	-0,001
Ac Húmico	0,113	0,087	0,045	0,095
Fe(OH)3	-0,002	0,004	0,001	0,002
CaCO3	0	0,002	-0,003	-0,001
Valencia	0,005	0,019	0,013	0,015
<b>Mn</b>				
Patrón de suelo	0,166	0,027	0,05	0,24
Mont	0,025	0,01	0,03	0,028
Ac Húmico	0,218	0,199	0,105	0,125
Fe(OH)3	0,012	0,006	0,011	0,019
CaCO3	0,007	0,017	0,024	0,024
Valencia	0,014	0,111	0,078	0,118
<b>Zn</b>				
Patrón de suelo	0,368	0,031	0,025	0,363
Mont	0,049	0,035	0,041	0,039
Ac Húmico	0,042	0,323	0,715	0,691
Fe(OH)3	0,012	0,03	0,03	0,014
CaCO3	0,019	0,044	0,029	0,146
Valencia	0,043	0,067	0,048	0,042

## ANEXO I

Tabla IV. Concentración de macronutrientes solubles (mg·L<sup>-1</sup>) en el extracto del obtenido tras el ensayo de interacción del Dolirón con los materiales del suelo.

Ca	Blancos			
Patrón de suelo	25,9	26,7	31,2	33,8
Mont	6,7	6,1	7,7	6,5
Ac Húmico	50,7	55,6	38,7	41,1
Fe(OH) <sub>3</sub>	0,1	0,6	0,8	23,8
CaCO <sub>3</sub>	5,5	100,7	70,3	78,6
Valencia	76,2	90,9	126,7	184
Mg				
Patrón de suelo	3,7	17,5	18,9	13,1
Suelo art				
Mont	1,8	23,7	19	17
Ac Húmico	3,1	9,5	5,1	6,6
Fe(OH) <sub>3</sub>	0	26,7	10,9	26,7
CaCO <sub>3</sub>	0,3	33,9	23,1	29
Valencia	9,1	23,2	22,4	24,5
K				
Patrón de suelo	5,5	7,8	6,9	19,2
Suelo art				
Mont	0,7	1,3	1	1,3
Ac Húmico	2,1	2,1	0,8	3,2
Fe(OH) <sub>3</sub>	-0,6	-0,8	0,5	-0,9
CaCO <sub>3</sub>	-0,5	-0,2	-0,2	-0,4
Valencia	12,7	16,7	15,3	18,1
Na				
Patrón de suelo	141	126	162	177
Mont	19,7	56,4	57,4	63,8
Ac Húmico	406	532	291	389
Fe(OH) <sub>3</sub>	7,6	17,9	16,5	16,8
CaCO <sub>3</sub>	7,7	7,7	6,6	7,9
Valencia	6,8	8,3	8,2	8,3

Tabla V. Concentración de micronutrientes extraíbles (mg·L<sup>-1</sup>) tras la aplicación de extractante Soltampour al Aquamato férrico.

Blancos				
Fe				
Patrón de suelo	12,64	17	12,77	14,885
Mont	0,46	1,045	0,75	2,05
Ac Húmico				
Fe(OH)3	33,18	34,12	35,58	28,12
CaCO3	0,33	0,52	2,92	0,86
Valencia	3,1	1,69	1,89	3,03
Cu				
Suelo art	1,168	2,031	2,6675	3,304
Mont	0,117	0,116	0,121	0,122
Ac Húmico	0,117	0,207	0,195	0,201
Fe(OH)3	0,258	0,137	0,162	0,15
CaCO3	0,08	0,115	0,135	0,085
Valencia	0,252	0,17	0,172	0,237
Mn				
Patrón de suelo	3,245	2,773	2	4,327
Mont	0,069	0,372	0,268	0,335
Ac Húmico	0,745	0,954	1,209	1,114
Fe(OH)3	0,394	0,596	0,755	0,565
CaCO3	0,011	0,1375	0,155	0,12
Valencia	1,636	0,643	0,589	1,764
Zn				
Patrón de suelo	1,281	1,822	1,166	4,203
Mont	0,191	0,22	0,303	0,243
Ac Húmico	0,303	0,324	0,417	0,397
Fe(OH)3	0,273	0,222	0,245	0,227
CaCO3	0,135	0,191	0,157	0,137
Valencia	0,546	0,433	0,783	0,622

## ANEXO I

Tabla VI. Concentración de macronutrientes extraíbles (mg·L<sup>-1</sup>) tras la aplicación de extractante Soltampour al Aquamato férrico.

Ca	Blancos			
Patrón de suelo	167	160,7	161,3	148,5
Mont	156,2	142,3	127,1	148,4
Ac Húmico	141,2	241,2	207,8	224,5
Fe(OH)3	12,4	16,7	29,1	26,2
CaCO3	166	250,2	171,8	172,2
Valencia	195,2	161,1	151	175,4
Mg				
Patrón de suelo	26,2	27,5	18,4	39
Mont	63	64	46	67,5
Ac Húmico	5,7	6,7	7,4	7,05
Fe(OH)3	2,1	2,3	3,7	3
CaCO3	0,8	1	1,2	1,2
Valencia	20,2	11	9,6	17,2
K				
Patrón de suelo	10,6	16,5	11,4	24,8
Mont	4,6	7,7	12	8,3
Ac Húmico	2,7	7	6,8	6,9
Fe(OH)3	-0,6	0,8	0,4	0,9
CaCO3	0,1	0,6	0,1	0,3
Valencia	65,7	35,3	44,7	53,2
Na				
Patrón de suelo	51,6	61,5	44,9	53,2
Mont	50,9	39,6	31,8	39,5
Ac Húmico	333,5	332,5	432,5	382,5
Fe(OH)3	7,2	6,8	7,3	6,7
CaCO3	5,5	5,2	5,3	5,6
Valencia	7,8	6,1	6,1	7,2

Tabla VII. Concentración de micronutrientes extraíbles (mg·L<sup>-1</sup>) tras la aplicación de extractante Soltampour al Doliron.

Fe	Blancos			
Patrón de suelo	12,64	13,49	24,34	17,89
Mont	0,46	1,62	1,54	1,58
Ac Húmico				
Fe(OH) <sub>3</sub>	33,18	45,15	48,36	35,04
CaCO <sub>3</sub>	0,33	2,58	1,43	4,46
Valencia	3,1	4,5	2,21	3,77
Cu				
Patrón de suelo	1,168	1,007	2,001	1,5
Mont	0,117	0,123	0,125	0,129
Ac Húmico	0,117	0,166	0,171	0,12
Fe(OH) <sub>3</sub>	0,258	0,139	0,146	0,115
CaCO <sub>3</sub>	0,08	0,097	0,091	0,084
Valencia	0,252	0,255	0,152	0,168
Mn				
Patrón de suelo	3,245	1,414	2,725	2,349
Mont	0,069	0,124	0,137	0,126
Ac Húmico	0,745	1,114	0,993	1,021
Fe(OH) <sub>3</sub>	0,394	0,374	0,53	0,283
CaCO <sub>3</sub>	0,011	0,06	0,045	0,049
Valencia	1,636	1,758	0,678	0,762
Zn				
Patrón de suelo	1,281	1,328	2,746	1,872
Mont	0,191	0,266	0,334	0,251
Ac Húmico	0,303	0,435	0,461	0,367
Fe(OH) <sub>3</sub>	0,273	0,373	0,207	0,174
CaCO <sub>3</sub>	0,135	0,148	0,157	0,152
Valencia	0,546	0,593	0,412	0,446

## ANEXO I

Tabla VIII. Concentración de macronutrientes extraíbles (mg·L<sup>-1</sup>) tras la aplicación de extractante Soltampour al Doliron.

Ca	Blancos			
Patrón de suelo	167	183,2	162,4	158,5
Mont	156,2	106,8	130	116,5
Ac Húmico	141,2	208,3	212,7	186,7
Fe(OH)3	12,4	61,8	65,1	41,6
CaCO3	166	167,9	182,8	179,9
Valencia	195,2	154,5	162,6	177
Mg				
Patrón de suelo	26,2	25,2	39,5	30
Mont	63	50,5	65	80,5
Ac Húmico	5,7	28,5	29,5	26,9
Fe(OH)3	2,1	10,1	10,9	5,9
CaCO3	0,8	2,2	2	2,3
Valencia	20,2	24,1	18,7	23,2
K				
Patrón de suelo	10,6	10,7	12,9	12,8
Mont	4,6	3,2	4,6	4,9
Ac Húmico	2,7	4,1	3,8	3,3
Fe(OH)3	-0,6	0,4	0,1	0
CaCO3	0,1	1,4	0	0,8
Valencia	65,7	43	33,5	41,8
Na				
Patrón de suelo	51,6	30,8	44,1	49,2
Mont	50,9	17	21,9	23,5
Ac Húmico	333,5	851	831	830
Fe(OH)3	7,2	6,3	6,7	5,5
CaCO3	5,5	5,5	6	6
Valencia	7,8	6,9	7,1	7,6



## **ANEXO II**



**Aplicación del programa de ajuste FGMINC**

Variable	Estimate	Gradient
Conc[1]	1.920E+0001	0.000E+0000
H_Mu[1]	3.24414	0.000E+0000
H_Sig[1]	1.92919	0.000E+0000
M_Mu[1]	0.00000	0.000E+0000
M_Sig[1]	0.00000	0.000E+0000
Conc[2]	7.232E+0000	0.000E+0000
H_Mu[2]	10.34383	0.000E+0000
H_Sig[2]	3.11507	0.000E+0000
M_Mu[2]	0.00000	0.000E+0000
M_Sig[2]	0.00000	0.000E+0000

Residual Sum of Squares = 2.903E+0000

Status = Converged in 1 Iteration(s)

Data.XH	Data.XM	Data.Y	Sites	H-Sites
9.260E-04	0.000E+00	9.607E+00	8.951E+00	1.748E+01
9.300E-04	0.000E+00	9.830E+00	8.944E+00	1.749E+01
9.210E-04	0.000E+00	9.755E+00	8.959E+00	1.747E+01
9.090E-04	0.000E+00	9.706E+00	8.980E+00	1.745E+01
8.910E-04	0.000E+00	9.764E+00	9.011E+00	1.742E+01
8.480E-04	0.000E+00	9.721E+00	9.088E+00	1.734E+01
7.580E-04	0.000E+00	9.534E+00	9.263E+00	1.717E+01
5.860E-04	0.000E+00	9.638E+00	9.660E+00	1.677E+01
4.240E-04	0.000E+00	9.839E+00	1.016E+01	1.627E+01
3.200E-04	0.000E+00	1.011E+01	1.060E+01	1.583E+01
2.440E-04	0.000E+00	1.040E+01	1.103E+01	1.540E+01
1.850E-04	0.000E+00	1.076E+01	1.148E+01	1.495E+01
1.420E-04	0.000E+00	1.120E+01	1.192E+01	1.451E+01
1.050E-04	0.000E+00	1.165E+01	1.241E+01	1.402E+01
8.320E-05	0.000E+00	1.210E+01	1.279E+01	1.364E+01
6.060E-05	0.000E+00	1.259E+01	1.329E+01	1.315E+01
4.740E-05	0.000E+00	1.295E+01	1.365E+01	1.278E+01

## ANEXO II

---

3.850E-05	0.000E+00	1.334E+01	1.396E+01	1.248E+01
2.790E-05	0.000E+00	1.388E+01	1.440E+01	1.203E+01
2.160E-05	0.000E+00	1.428E+01	1.474E+01	1.169E+01
1.640E-05	0.000E+00	1.465E+01	1.510E+01	1.134E+01
1.410E-05	0.000E+00	1.496E+01	1.529E+01	1.114E+01
8.700E-06	0.000E+00	1.556E+01	1.589E+01	1.055E+01
7.030E-06	0.000E+00	1.583E+01	1.614E+01	1.029E+01
5.660E-06	0.000E+00	1.617E+01	1.640E+01	1.003E+01
3.550E-06	0.000E+00	1.667E+01	1.692E+01	9.516E+00
2.670E-06	0.000E+00	1.689E+01	1.721E+01	9.225E+00
2.540E-06	0.000E+00	1.707E+01	1.726E+01	9.176E+00
2.040E-06	0.000E+00	1.718E+01	1.746E+01	8.971E+00
1.760E-06	0.000E+00	1.730E+01	1.759E+01	8.840E+00
1.310E-06	0.000E+00	1.753E+01	1.784E+01	8.595E+00
1.090E-06	0.000E+00	1.771E+01	1.798E+01	8.451E+00
5.930E-07	0.000E+00	1.800E+01	1.842E+01	8.014E+00
5.860E-07	0.000E+00	1.813E+01	1.843E+01	8.006E+00
4.550E-07	0.000E+00	1.824E+01	1.860E+01	7.833E+00
3.870E-07	0.000E+00	1.836E+01	1.871E+01	7.723E+00
1.830E-07	0.000E+00	1.860E+01	1.921E+01	7.220E+00
1.810E-07	0.000E+00	1.873E+01	1.922E+01	7.213E+00
1.240E-07	0.000E+00	1.884E+01	1.947E+01	6.964E+00
1.040E-07	0.000E+00	1.897E+01	1.958E+01	6.852E+00
6.670E-08	0.000E+00	1.908E+01	1.985E+01	6.582E+00
5.820E-08	0.000E+00	1.920E+01	1.993E+01	6.505E+00
3.480E-08	0.000E+00	1.932E+01	2.019E+01	6.240E+00
3.350E-08	0.000E+00	1.944E+01	2.021E+01	6.222E+00
1.740E-08	0.000E+00	1.954E+01	2.048E+01	5.948E+00
1.310E-08	0.000E+00	1.964E+01	2.059E+01	5.846E+00
9.750E-09	0.000E+00	1.975E+01	2.069E+01	5.746E+00
7.690E-09	0.000E+00	1.985E+01	2.076E+01	5.670E+00
5.660E-09	0.000E+00	1.999E+01	2.086E+01	5.573E+00
3.960E-09	0.000E+00	2.012E+01	2.097E+01	5.457E+00
3.230E-09	0.000E+00	2.019E+01	2.104E+01	5.388E+00
2.690E-09	0.000E+00	2.033E+01	2.111E+01	5.323E+00
1.650E-09	0.000E+00	2.050E+01	2.130E+01	5.129E+00
1.480E-09	0.000E+00	2.057E+01	2.135E+01	5.082E+00
1.190E-09	0.000E+00	2.068E+01	2.145E+01	4.983E+00
9.250E-10	0.000E+00	2.080E+01	2.157E+01	4.862E+00
7.670E-10	0.000E+00	2.092E+01	2.166E+01	4.768E+00
5.640E-10	0.000E+00	2.116E+01	2.182E+01	4.610E+00
4.150E-10	0.000E+00	2.132E+01	2.198E+01	4.453E+00
3.300E-10	0.000E+00	2.149E+01	2.209E+01	4.339E+00
2.400E-10	0.000E+00	2.168E+01	2.224E+01	4.189E+00

## ANEXO II

---

1.860E-10	0.000E+00	2.187E+01	2.235E+01	4.080E+00
1.350E-10	0.000E+00	2.200E+01	2.248E+01	3.956E+00
1.080E-10	0.000E+00	2.231E+01	2.255E+01	3.879E+00
7.260E-11	0.000E+00	2.265E+01	2.268E+01	3.755E+00
5.550E-11	0.000E+00	2.293E+01	2.275E+01	3.679E+00
9.250E-04	0.000E+00	8.913E+00	8.952E+00	1.748E+01
9.270E-04	0.000E+00	9.087E+00	8.949E+00	1.748E+01
9.270E-04	0.000E+00	9.025E+00	8.949E+00	1.748E+01
9.180E-04	0.000E+00	9.259E+00	8.964E+00	1.747E+01
9.000E-04	0.000E+00	9.314E+00	8.995E+00	1.744E+01
8.630E-04	0.000E+00	9.401E+00	9.061E+00	1.737E+01
7.870E-04	0.000E+00	9.558E+00	9.204E+00	1.723E+01
6.340E-04	0.000E+00	9.807E+00	9.539E+00	1.689E+01
4.650E-04	0.000E+00	1.009E+01	1.002E+01	1.641E+01
3.510E-04	0.000E+00	1.043E+01	1.045E+01	1.598E+01
2.720E-04	0.000E+00	1.090E+01	1.086E+01	1.557E+01
1.970E-04	0.000E+00	1.130E+01	1.138E+01	1.505E+01
1.540E-04	0.000E+00	1.174E+01	1.178E+01	1.465E+01
1.160E-04	0.000E+00	1.223E+01	1.225E+01	1.418E+01
8.770E-05	0.000E+00	1.264E+01	1.270E+01	1.373E+01
6.860E-05	0.000E+00	1.304E+01	1.309E+01	1.334E+01
5.220E-05	0.000E+00	1.350E+01	1.351E+01	1.292E+01
4.070E-05	0.000E+00	1.396E+01	1.388E+01	1.256E+01
3.050E-05	0.000E+00	1.444E+01	1.428E+01	1.215E+01
2.300E-05	0.000E+00	1.487E+01	1.466E+01	1.177E+01
1.790E-05	0.000E+00	1.524E+01	1.498E+01	1.145E+01
1.460E-05	0.000E+00	1.559E+01	1.524E+01	1.119E+01
1.020E-05	0.000E+00	1.628E+01	1.569E+01	1.074E+01
8.120E-06	0.000E+00	1.641E+01	1.597E+01	1.046E+01
6.240E-06	0.000E+00	1.674E+01	1.628E+01	1.015E+01
4.760E-06	0.000E+00	1.701E+01	1.660E+01	9.837E+00
4.170E-06	0.000E+00	1.724E+01	1.674E+01	9.689E+00
2.690E-06	0.000E+00	1.769E+01	1.720E+01	9.232E+00
2.170E-06	0.000E+00	1.786E+01	1.740E+01	9.028E+00
1.870E-06	0.000E+00	1.804E+01	1.754E+01	8.893E+00
1.140E-06	0.000E+00	1.839E+01	1.795E+01	8.486E+00
9.990E-07	0.000E+00	1.851E+01	1.805E+01	8.386E+00
6.800E-07	0.000E+00	1.875E+01	1.832E+01	8.109E+00
6.000E-07	0.000E+00	1.887E+01	1.841E+01	8.022E+00
3.660E-07	0.000E+00	1.910E+01	1.875E+01	7.686E+00
3.340E-07	0.000E+00	1.923E+01	1.881E+01	7.624E+00
2.920E-07	0.000E+00	1.935E+01	1.890E+01	7.533E+00
1.640E-07	0.000E+00	1.953E+01	1.928E+01	7.147E+00
1.420E-07	0.000E+00	1.965E+01	1.938E+01	7.052E+00

## ANEXO II

1.350E-07	0.000E+00	1.977E+01	1.941E+01	7.019E+00
8.050E-08	0.000E+00	1.989E+01	1.974E+01	6.693E+00
6.120E-08	0.000E+00	2.001E+01	1.990E+01	6.533E+00
3.280E-08	0.000E+00	2.024E+01	2.022E+01	6.212E+00
2.640E-08	0.000E+00	2.036E+01	2.032E+01	6.115E+00
1.360E-08	0.000E+00	2.057E+01	2.057E+01	5.859E+00
1.190E-08	0.000E+00	2.069E+01	2.062E+01	5.813E+00
1.160E-08	0.000E+00	2.081E+01	2.063E+01	5.804E+00
6.960E-09	0.000E+00	2.088E+01	2.079E+01	5.638E+00
6.020E-09	0.000E+00	2.099E+01	2.084E+01	5.592E+00
4.790E-09	0.000E+00	2.108E+01	2.091E+01	5.519E+00
4.200E-09	0.000E+00	2.117E+01	2.096E+01	5.477E+00
2.870E-09	0.000E+00	2.133E+01	2.109E+01	5.346E+00
2.690E-09	0.000E+00	2.143E+01	2.111E+01	5.323E+00
2.630E-09	0.000E+00	2.155E+01	2.112E+01	5.314E+00
1.870E-09	0.000E+00	2.167E+01	2.125E+01	5.182E+00
1.810E-09	0.000E+00	2.178E+01	2.126E+01	5.168E+00
1.520E-09	0.000E+00	2.182E+01	2.134E+01	5.094E+00
1.370E-09	0.000E+00	2.188E+01	2.138E+01	5.048E+00
1.140E-09	0.000E+00	2.201E+01	2.147E+01	4.963E+00
9.130E-10	0.000E+00	2.220E+01	2.158E+01	4.856E+00
6.320E-10	0.000E+00	2.242E+01	2.176E+01	4.669E+00
5.180E-10	0.000E+00	2.257E+01	2.187E+01	4.566E+00
3.890E-10	0.000E+00	2.285E+01	2.201E+01	4.420E+00
2.760E-10	0.000E+00	2.304E+01	2.218E+01	4.253E+00
2.300E-10	0.000E+00	2.330E+01	2.226E+01	4.170E+00
1.610E-10	0.000E+00	2.350E+01	2.241E+01	4.022E+00
1.340E-10	0.000E+00	2.383E+01	2.248E+01	3.953E+00
1.060E-03	0.000E+00	8.325E+00	8.738E+00	1.769E+01
1.060E-03	0.000E+00	8.444E+00	8.738E+00	1.769E+01
1.050E-03	0.000E+00	8.364E+00	8.753E+00	1.768E+01
1.040E-03	0.000E+00	8.375E+00	8.768E+00	1.766E+01
1.020E-03	0.000E+00	8.456E+00	8.798E+00	1.763E+01
9.840E-04	0.000E+00	8.463E+00	8.855E+00	1.758E+01
9.080E-04	0.000E+00	8.534E+00	8.981E+00	1.745E+01

**ANEXO II**

Data.XH	Data.XM	Data.Y	Sites	H-Sites
7.680E-04	0.000E+00	8.818E+00	9.242E+00	1.719E+01
5.630E-04	0.000E+00	9.298E+00	9.722E+00	1.671E+01
4.240E-04	0.000E+00	9.810E+00	1.016E+01	1.627E+01
3.210E-04	0.000E+00	1.032E+01	1.060E+01	1.584E+01
2.420E-04	0.000E+00	1.080E+01	1.105E+01	1.539E+01
1.890E-04	0.000E+00	1.129E+01	1.145E+01	1.498E+01
1.400E-04	0.000E+00	1.180E+01	1.194E+01	1.449E+01
1.110E-04	0.000E+00	1.228E+01	1.232E+01	1.411E+01
7.930E-05	0.000E+00	1.281E+01	1.287E+01	1.357E+01
6.490E-05	0.000E+00	1.322E+01	1.318E+01	1.325E+01
4.510E-05	0.000E+00	1.380E+01	1.373E+01	1.270E+01
3.770E-05	0.000E+00	1.421E+01	1.399E+01	1.245E+01
2.330E-05	0.000E+00	1.495E+01	1.464E+01	1.179E+01
1.940E-05	0.000E+00	1.530E+01	1.488E+01	1.155E+01
1.340E-05	0.000E+00	1.590E+01	1.535E+01	1.108E+01
1.030E-05	0.000E+00	1.626E+01	1.568E+01	1.075E+01
8.160E-06	0.000E+00	1.660E+01	1.596E+01	1.047E+01
6.120E-06	0.000E+00	1.698E+01	1.631E+01	1.013E+01
4.610E-06	0.000E+00	1.730E+01	1.663E+01	9.801E+00
3.620E-06	0.000E+00	1.756E+01	1.690E+01	9.537E+00
2.820E-06	0.000E+00	1.783E+01	1.715E+01	9.279E+00
2.350E-06	0.000E+00	1.810E+01	1.733E+01	9.102E+00
1.170E-06	0.000E+00	1.870E+01	1.793E+01	8.506E+00
9.100E-07	0.000E+00	1.885E+01	1.812E+01	8.317E+00
7.440E-07	0.000E+00	1.897E+01	1.826E+01	8.172E+00
6.250E-07	0.000E+00	1.912E+01	1.838E+01	8.050E+00
3.630E-07	0.000E+00	1.942E+01	1.875E+01	7.680E+00
2.840E-07	0.000E+00	1.951E+01	1.892E+01	7.515E+00
2.540E-07	0.000E+00	1.957E+01	1.899E+01	7.440E+00
1.880E-07	0.000E+00	1.969E+01	1.919E+01	7.238E+00
1.700E-07	0.000E+00	1.975E+01	1.926E+01	7.171E+00
1.220E-07	0.000E+00	1.987E+01	1.948E+01	6.953E+00
1.080E-07	0.000E+00	1.994E+01	1.956E+01	6.875E+00
7.500E-08	0.000E+00	2.006E+01	1.978E+01	6.651E+00
6.620E-08	0.000E+00	2.012E+01	1.985E+01	6.578E+00
4.410E-08	0.000E+00	2.023E+01	2.008E+01	6.357E+00
4.050E-08	0.000E+00	2.030E+01	2.012E+01	6.314E+00
3.670E-08	0.000E+00	2.036E+01	2.017E+01	6.265E+00
2.430E-08	0.000E+00	2.047E+01	2.035E+01	6.080E+00
2.190E-08	0.000E+00	2.053E+01	2.039E+01	6.037E+00
1.280E-08	0.000E+00	2.064E+01	2.059E+01	5.837E+00
1.300E-08	0.000E+00	2.070E+01	2.059E+01	5.843E+00
1.070E-08	0.000E+00	2.075E+01	2.066E+01	5.777E+00

## ANEXO II

9.780E-09	0.000E+00	2.081E+01	2.068E+01	5.747E+00
6.050E-09	0.000E+00	2.091E+01	2.084E+01	5.594E+00
6.200E-09	0.000E+00	2.097E+01	2.083E+01	5.602E+00
5.190E-09	0.000E+00	2.102E+01	2.089E+01	5.545E+00
4.900E-09	0.000E+00	2.107E+01	2.091E+01	5.527E+00
3.990E-09	0.000E+00	2.111E+01	2.097E+01	5.460E+00
3.460E-09	0.000E+00	2.116E+01	2.102E+01	5.412E+00
2.740E-09	0.000E+00	2.124E+01	2.110E+01	5.329E+00
2.040E-09	0.000E+00	2.137E+01	2.122E+01	5.217E+00
1.520E-09	0.000E+00	2.148E+01	2.134E+01	5.094E+00
1.200E-09	0.000E+00	2.155E+01	2.144E+01	4.987E+00
9.670E-10	0.000E+00	2.164E+01	2.155E+01	4.884E+00
7.320E-10	0.000E+00	2.180E+01	2.169E+01	4.744E+00
4.990E-10	0.000E+00	2.194E+01	2.189E+01	4.547E+00
4.050E-10	0.000E+00	2.203E+01	2.199E+01	4.440E+00
2.930E-10	0.000E+00	2.215E+01	2.215E+01	4.281E+00
2.230E-10	0.000E+00	2.221E+01	2.228E+01	4.157E+00
1.660E-10	0.000E+00	2.219E+01	2.240E+01	4.034E+00
1.320E-10	0.000E+00	2.218E+01	2.248E+01	3.948E+00